

Iterative NRPS-Systeme
-
Charakterisierung der Gramacidin S-Thioesterase
und Analyse der
Thiocoralin-3-Hydroxychinaldinsäure-Biosynthese

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Maria-Katharina Hoyer

aus Lüneburg (Niedersachsen)

Marburg/ Lahn 2008

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden vom Februar 2005 bis November 2008 am Fachbereich Chemie/ Biochemie der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Prof. Dr. M. A. Marahiel durchgeführt.

Vom Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am _____ angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. M. A. Marahiel
Zweitgutachter: Prof. Dr. L.-O. Essen

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Dezember 2008

Zusammenfassung

Bakterielle, fungale und pflanzliche multimodulare Enzyme generieren eine Vielzahl von Sekundärmetaboliten mit pharmakologisch interessanten Eigenschaften. Zur fermentativen, semisynthetischen oder chemoenzymatischen Darstellung dieser Naturstoffe und deren optimierten Derivaten ist ein detailliertes Wissen ihrer Biosynthese oder der beteiligten Enzyme Voraussetzung. Im Rahmen dieser Arbeit sollten wichtige Aspekte der Biosynthese der iterativen nicht-ribosomalen Produkte Gramacidin S, ein potentes Antibiotikum, und Thiocoralin, ein Anti-Tumor-Mittel, geklärt werden. Iterative nicht-ribosomale Produkte zeichnen sich durch eine aus repetitiven Einheiten aufgebaute zyklische Struktur und den Einbau von nicht-proteinogenen Bausteinen aus. Sowohl die hieraus resultierende rigide Struktur als auch die Eigenschaften der nicht-proteinogenen Bausteine sind für die biologische Aktivität oft entscheidend.

Im ersten Teil der Arbeit wurde die Schlüsselreaktion einer iterativen nicht-ribosomalen Peptidsynthetase, die Thioesterasen-katalysierte Verknüpfung der repetitiven Einheiten und die anschließende Zyklisierung, untersucht. Hierzu wurde die rekombinante Gramacidin S Thioesterase aus *Bacillus brevis* in *E. coli* heterolog exprimiert und mit einem chemoenzymatischen Ansatz charakterisiert. Die Umsetzung verschiedener Peptidylthioestersubstrate zeigte hierbei, dass die Thioesterase *in vitro* sowohl eine Ligation als auch eine Zyklisierung katalysiert. Das Auftreten eines linearen N-Acetylcysteamin aktivierten Ligationsintermediates lässt einen *in vivo*-Mechanismus vermuten, indem das Ligationsprodukt zunächst an die nebenstehende Peptidyl-Carrier-Protein-Domäne gebunden vorliegt und erst anschließend wieder auf die Thioesterase zur Zyklisierung übertragen wird (*Backward Mechanismus*). Durch Inkubation mit Peptidylthioestersubstraten verschiedener Länge konnten neben Dimerisierungen auch Trimerisierungen beobachtet werden, die durch anschließende Zyklisierung zu verschiedenen Zyklusgrößen führten. Das biokombinatorische Potential der Thioesterase wird durch die Umsetzung von Substratmischungen, die zu Zyklen aus unterschiedlichen Substraten aufgebaut werden, deutlich. Weiterhin wurde das Ligationspotential der Thioesterase untersucht und als längstes Produkt ein Heptadekapeptid erhalten.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde ein Schlüsselschritt der 3-Hydroxychinaldinsäure-Biosynthese untersucht. Dieses Pharmakophor ist für die DNA-bisinterkalativen Eigenschaften des Anti-Tumor-Wirkstoffes Thiocoralin entscheidend. Durch heterologe Expression der Proteine TioI, TioG, TioF, TioK und der Peptidyl-Carrier-Protein-Domäne (PCP-Domäne) von TioK sowie die *in vitro*-Umsetzung mit möglichen Substraten konnten Schlüsselschritte der Biosynthese geklärt werden. So zeigen die Ergebnisse, dass, entgegen der postulierten Biosynthese, TioI die β -Hydroxylierung von PCP-Domänen-gebundenem Tryptophan katalysiert und dass nach erfolgter Abspaltung des β -Hydroxytryptophans von der Synthetase TioK die weiteren Biosyntheseschritte katalysiert werden.

Ein Teil der vorliegenden Arbeit wurde bereits in der folgenden Publikation veröffentlicht:

Hoyer, K.M., Mahlert, C. und Marahiel, M.A. (2007). The iterative Gramicidin S Thioesterase catalyzes Peptide Ligation and Cyclization, *ChemBiol*, 14, 13-22.

Hoyer, K.M. und Marahiel, M.A. (2008). Tryptophan β -Hydroxylation as a Key Step in Thiocoraline 3-Hydroxyquinaldic Acid Biosynthesis. In Bearbeitung.

Weitere Publikationen:

Robbel, L., Hoyer, K.M. und Marahiel, M.A. (2008). TioS T-TE - a Prototypical Thioesterase responsible for Cyclodimerization of the Quinoline- and Quinoxaline-Type Class of Chromodepsipeptides, *FEBS Journal*, Eingereicht.

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Titel „Iterative NRPS-Systeme – Charakterisierung der Gramacidin S-Thioesterase und Analyse der Thiocoralin-3-Hydroxychinladinsäure-Biosynthese“ selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe. Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

(Ort, Datum)

Maria-Katharina Hoyer

Abkürzungen

Abb.	Abbildung	Hepes	2-N`-[N-(2-Hydroxyethyl)-
A-Domäne	Adenylierungsdomäne		Piperazinyl]-
ADP	Adenosin-5`-diphosphat		Ethansulfonsäure
ATCC	Stammsammlung (American	HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
	Type Culture Collection)	3HQA	3-Hydroxychinaldinsäure
ATP	Adenosin-5`-Triphosphat	IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
Boc	Tert-Butyloxycarbonyl	IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalacto-
C-Domäne	Kondensationsdomäne		Pyranosid
CDA	Kalzium-abhängiges	kan	Kanamycin
	Antibiotikum	kb	Kilobasen
CoA	Koenzym A	kDa	Kilodalton
Cyp	Cytochrome P450	Kyn	Kynurenin
Da	Dalton	Kyn-Säure	Kynureninsäure
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid	L	Liter
DCM	Dichlormethan	M-Domäne	Methylierungsdomäne
DIPEA	Diisopropylethylamin	MALDI-TOF	Matrix-unterstützte
DMF	N,N-Dimethylformamid		Laserdesorption-Flugzeit
DMSO	Dimethylsulfoxid	min	Minuten
E-Domäne	Epimerisierungsdomäne	mL	Milliliter
ESI-MS	Elektrospray-Ionisations-	MW	Molekulargewicht
	Massenspektrometrie	nb.	Nicht bestimmt
Fmoc	9-Fluorenyl-Methyl-	NRP	Nicht-ribosomales Peptid/
	Oxycarbonyl		Nicht-ribosomale Peptide
N-Form-Kyn	N`-Formylkynurenin	NRPS	Nicht-ribosomale
FPLC	Schnelle		Peptidsynthetase/
	Flüssigkeitschromatographie		Peptidsynthetasen
h	Stunde	OD	Optische Dichte

Orn	Ornithin	RT	Raumtemperatur
PAGE	Polyacrylamid- Gelelektrophorese	SAM	S-Adenosyl-Methionin
PCP-Domäne	Peptidyl-Carrier-Protein- Domäne	SDS	Natriumdodecylsulfat
		SNAC	N-Acetylcysteamin
		SPPS	Peptid-Festphasensynthese
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>	Tab.	Tabelle
pI	Isoelektrischer Punkt	tBu	Tert.-Butyl
PKS	Polyketidsynthase/ Polyketidsynthese	TDO	Tryptophan-2,3- Dioxygenase
PLP	Pyridoxal-5`-Phosphat	TE-Domäne	Thioesterasedomäne
PMP	Pyridoxamin-Phosphat	TFA	Trifluoressigsäure
Ppan	4`-Phosphopantethein	TFE	Trifluorethanol
PPi	Anorganisches Phosphat	TIPS	Triisopropylsilan
PPTase	4`-Phosphopantetheinyl- Transferase	t_R	Retentionszeit
		Tris	Tris-(Hydroxymethyl)- Aminomethan
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxy-tris- t		
	Pyrrolidino-Phosphonium- Hexafluorophosphat	Upm	Umdrehungen pro Minute
		UV	Ultraviolett
QA	Chinaldinsäure	v/ v	Volumen/ Volumen
QC	Chinoxalinsäure	WT	Wildtyp
R-Domäne	Reduktasedomäne	w/ v	Masse/ Volumen
RP-HPLC	Umkehrphasen- Hochleistungs- Flüssigkeitschromatographie		

Proteinogene Aminosäuren: Abkürzungen und relative Molmasse

Aminosäure	3-Buchstabenkode	1-Buchstabenkode	Molekulargewicht [g/mol]
Alanin	Ala	A	89
Arginin	Arg	R	174
Asparagin	Asn	N	132
Aspartat	Asp	D	133
Cystein	Cys	C	121
Glutamin	Gln	Q	146
Glycin	Gly	G	75
Histidin	His	H	155
Isoleucin	Ile	I	131
Leucin	Leu	L	131
Lysin	Lys	K	146
Methionin	Met	M	149
Phenylalanin	Phe	F	165
Prolin	Pro	P	115
Serin	Ser	S	105
Threonin	Thr	T	119
Tryptophan	Trp	W	204
Tyrosin	Tyr	Y	181
Valin	Val	V	117

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	III
Abkürzungen	VI
Inhaltsverzeichnis.....	IX
1. Einleitung	1
1.1 Iterative nicht-ribosomale Produkte	2
1.2 Mechanismus der nicht-ribosomalen Peptidsynthese	4
1.3 Die Thioesterase.....	8
1.4 Klassifizierung der NRPS	10
1.5 Terminationsstrategien der iterativen NRPS.....	12
1.6 Das Peptidantibiotikum Gramicidin S.....	15
1.6.1 Struktur und Wirkungsmechanismus von Gramicidin S.....	15
1.6.2 Biosynthese von Gramicidin S.....	17
1.7 Synthesestrategien für Bausteine der NRPS	18
1.8 Das Chromodepsipeptid Thiocoralin	21
1.8.1 Struktur und Wirkungsmechanismus von Thiocoralin.....	21
1.8.2 Biosynthese von Thiocoralin.....	23
1.8.3 3-Hydroxychinaldinsäure-Biosynthese	24
1.9 Aufgabenstellung	26
2. Material	27
2.1 Geräte	27
2.2 Chemikalien und Enzyme	29
2.3 Vektoren	30
2.3.1 pQE60-Vektor	30
2.3.2 pET-Vektoren.....	30
2.3.3 pBAD _{M30} -Vektor	31
2.3.4 pBAD ₂₀₂ D/TOPO-Vektor.....	31
2.3.5 pGEX-Vektor	31
2.3.6 pREP4-Vektor	32
2.4 Mikroorganismen	32
2.4.1 <i>Escherichia coli</i> TOP10	32

2.4.2 <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3).....	32
2.4.3 <i>Escherichia coli</i> M15/ pREP4.....	32
2.4.4 <i>Micromonospora L-13-ACM2-092</i>	32
2.4.5 <i>Bacillus brevis</i> ATCC 9999	33
2.5 Medien.....	33
2.5.1 LB-Medium.....	33
2.5.2 MS-Medium	33
3. Methoden.....	35
3.1 Molekularbiologische Methoden.....	35
3.1.1 Konstruktion der Plasmide.....	35
3.1.1.1 Die Gramicidin S NRP-Synthetase-Konstrukte	35
3.1.1.2 Die Thiocoralin-Cluster-Konstrukte	36
3.1.2 Präparation von chromosomaler DNA.....	38
3.1.3 Sequenzierung der DNA-Konstrukte	39
3.2 Proteinchemische Methoden	39
3.2.1 Genexpression	39
3.2.2 Proteinreinigung.....	40
3.2.2.1 Zellaufschluss.....	40
3.2.2.2 Ni-NTA-Chromatographie	41
3.2.2.3 Glutathion-S-Transferase (GST)-Affinitätschromatographie	42
3.2.2.4 Gelfiltrationschromatographie	42
3.2.2.5 Abspaltung des GST-Tags	43
3.2.2.6 Dialyse und Ankonzentration der rekombinanten Proteine	43
3.2.2.7 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	43
3.3 Biochemische und Analytische Methoden.....	44
3.3.1 GrsB TE/ PCP-TE vermittelte Ligation und Peptidzyklisierung	44
3.3.2 Bestimmung des Hämgehaltes von TioI	46
3.3.3 Differenzspektroskopie/ Substrattitraktionen.....	47
3.3.4 TioI-katalysierter Oxidationsassay.....	47
3.3.5 ATP/ PPi -Austauschreaktion.....	48
3.3.6 Präparation und Reinigung von beladenem PCP	49
3.3.7 TioG-katalysierter Aminotransferasenassay	49

3.3.8 TioF-katalysierter Oxidationsassay.....	50
3.3.9 Gewinnung von N'-Formylkynurenin.....	50
3.3.10 Proteinidentifikation.....	50
3.4 Festphasenpeptidsynthese und Organische Synthese.....	51
3.4.1 Festphasenpeptidsynthese	51
3.4.2 Thioestersynthesen	52
3.4.3 Terminale Entschützung der thioesteraktivierten Aminosäuren und Peptide	52
3.4.4 Reinigung mittels präparativer HPLC.....	52
4. Ergebnisse	54
4.1 Charakterisierung der iterativen Gramacidin S-Thioesterase	54
4.1.1 Expression der iterativen Gramacidin S-Thioesterase.....	54
4.1.3 Substratsynthese	55
4.1.4 Umsetzung des nativen Penta- und Dekapeptides.....	57
4.1.5 Substratspezifität von GrsB PCP-TE	60
4.1.6 Umsetzung mit Substraten verschiedener Länge	61
4.1.7 Umsetzung von Mischungen aus verschiedenen Substraten.....	64
4.1.8 Die Ligationsreaktion.....	65
4.2 Die Biosynthese des Thiocoralin Chromophors 3-Hydroxychinaldinsäure.....	69
4.2.1 Anzucht von <i>Micromonospora</i> L-13-ACM2-092	69
4.2.2 Klonierung und Expression von TioI, TioG und TioF.....	69
4.2.3 TioF-katalysierter Dioxygenierungsassay.....	72
4.2.4 TioG-katalysierter Aminotransferasenassay	73
4.2.5 Bindungsstudien von TioI mit Chinaldinsäure.....	74
4.2.6 Expression von TioK und der PCP-Domäne aus TioK.....	75
4.2.7 Darstellung von PCP-gebundenem Tryptophan.....	78
4.2.8 Bindungsstudien von TioI mit alternativen Substraten	79
4.2.9 TioI-katalysierter Hydroxylierungsassay	80
4.2.10 Umsetzung von Indol-3-Carboxaldehyd mit TioF	81
4.2.11 Umsetzung von Trp-PCP mit TioF	82
5. Diskussion	83
5.1 Charakterisierung der iterativen Gramacidin S-Thioesterase	83
5.1.1 Gramacidin S-Thioesterase vermittelte Dimerisierung und Zyklisierung.....	83

5.1.2 Substrattoleranz der Gramicidin S-Thioesterase.....	84
5.1.3 Ausschlussprinzipien für die beobachteten Ringgrößen.....	85
5.1.6 Synthetisches Potential der Gramicidin S-Thioesterase.....	88
5.1.7 Die Ligationsreaktion der Gramicidin S-Thioesterase.....	89
5.1.8 Mechanismus der iterativen Thioesterase	90
5.2 Analyse der Chromophorbiosynthese des Thiocoralins.....	92
5.2.1 Die Tryptophan-2,3-Dioxygenase TioF	92
5.2.2 Die Aminotransferase TioG	94
5.2.3 Die Monooxygenase TioI.....	94
5.2.4 Substratselektivität von TioI	95
5.2.5 TioI-katalysierte Umsetzung von Trp-PCP	97
5.2.6 Neue Erkenntnisse zum Biosyntheseweg der 3-Hydroxychinaldinsäure.....	98
5.2.7 Ausblick zur Thiocoralin-Biosynthese.....	99
6. Anhang	101
6.1 MS/ MS-Sequenzierungen	101
6.2 Thiocoralin-Sequenzen.....	105
6.3 Thiocoralin-Cluster	111
7. Literatur	113

1. Einleitung

Naturstoffe werden schon seit vielen Jahren in der Medizin zur Heilung von Krankheiten verwendet. Zum Beispiel wurde schon vor hunderten von Jahren die Weidenrinde zur Bekämpfung von Schmerzen verwendet. Erst viel später konnte der Wirkstoff Salicylsäure (Salix = Weide) identifiziert werden. Im Jahr 1899 kam ein synthetisch hergestelltes Derivat dieses Naturstoffes, die Acetylsalicylsäure, als Aspirin auf den Markt [Vainio & Morgan, 1997].

Bis in die heutige Zeit werden in der Medizin Naturstoffe oder ihre Leitstrukturen verwendet. Schaut man sich die Zulassungen von 1981 bis 2006 an, so nehmen die rein synthetisch dargestellten Verbindungen einen Anteil von 30% ein (Abb. 1.1) [Newman & Cragg, 2007]. Die Natur dient also weiterhin als Leitbild in der Pharmaforschung. Dieses begründet auch das stetige Interesse an der Identifikation neuer Naturstoffe.

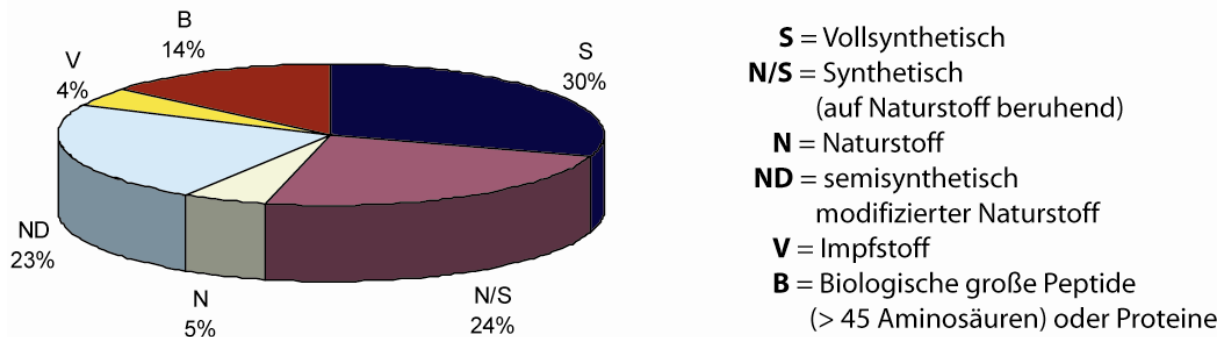


Abbildung 1.1: Zusammenfassung aller neu zugelassenen Wirkstoffe von 1981-2006 [Newman & Cragg, 2007].

Fast immer sind diese Naturstoffe Sekundärmetabolite von Pflanzen, Bakterien oder Pilzen. Sie haben für den Produzenten keine essentielle Funktion und dienen z. B. als chemische Verteidigung (Antibiotika) gegen konkurrierende Bakterien, als Signalstoffe oder sind Pathogenitätsfaktoren, wie Siderophore, die die Zufuhr von Eisen für den Produzenten sichern.

Neben der Entdeckung ist die Aufklärung der Biosynthese für die pharmakologische Anwendung von Sekundärmetaboliten essentiell. Dieses dient zum Einen der Optimierung von Fermentationsbedingungen. Ein Beispiel hierfür ist das Antibiotikum Daptomycin, das unter dem Namen Cubicin 2003 auf den Markt gekommen ist. Für die optimierte Produktion des Antibiotikums in *Streptomyces roseosporus* muss ein Baustein des Endproduktes, die Dekansäure, zugefüttert werden [Baltz *et al.*, 2005]. Des Weiteren ermöglicht die genetische

Manipulation der Biosynthese die fermentative Gewinnung von neuen, optimierten Naturstoffanaloga. Da die chemische und strukturelle Komplexität von Naturstoffen oft die synthetische Darstellung erschwert, können auch chemoenzymatische Ansätze oder semisynthetische Strategien zur Produktion neuer, optimierter Naturstoffderivate zum Einsatz kommen. Ein Beispiel für ein semisynthetisches Produkt ist Dalfopristin, ein Pristinamycin-Derivat. Es gehört zu den Streptogramin-Antibiotika und wird zusammen mit Quinupristin (Synercid) gegen Infektionen durch Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE) und Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* Stämme (MRSA) angewendet.

Ein Grund für das stetige Interesse an neuen oder optimierten Sekundärmetaboliten der Antibiotikaforschung ist die rasante Entwicklung von Resistenzen bei den Mikroorganismen [Walsh, 2000]. So sterben obgleich diverser vorhandener Antibiotika jährlich etwa 175.000 Menschen in Europa an bakteriellen Infektionskrankheiten [Leopoldina, 2007].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Biosynthese einer Subklasse von Sekundärmetaboliten untersucht, die über die iterative nicht-ribosomale Peptidsynthese dargestellt werden. Im Folgenden soll nach einer kurzen Vorstellung iterativer nicht-ribosomaler Produkte ihre Biosynthese erläutert werden. Hierzu werden zunächst die allgemeinen Prinzipien der nicht-ribosomalen Peptidsynthese erläutert und anschließend auf die Besonderheiten der iterativen Synthese eingegangen. Weiterhin werden die iterativen nicht-ribosomalen Peptide (NRP) Gramicidin S und Thiocoralin genauer beschrieben, da sie eine zentrale Position in dieser Arbeit einnehmen.

1.1 Iterative nicht-ribosomale Produkte

Multimodulare Enzyme generieren eine Vielzahl an Sekundärmetaboliten [Felnagle *et al.*, 2008]. Diese nicht-ribosomalen Peptide (NRP), Polyketide (PK) oder Hybrid NRP/PK-Produkte haben dabei zumeist bemerkenswerte pharmakologische Eigenschaften oder inspirieren aufgrund ihrer Notwendigkeit für den Produzentenstamm wie z. B. Siderophore zur Synthese von Antibiotika [Felnagle *et al.*, 2008; Sattely *et al.*, 2008]. Eine kleine und dennoch vielfältige Sparte bilden hierbei die iterativen nicht-ribosomalen Peptidsynthetase Produkte, die sich durch den Aufbau aus sich wiederholenden Aminosäuresequenzen auszeichnen [Mootz *et al.*, 2002]. Iterative NRPS-Produkte besitzen, wie auch viele andere Sekundärmetabolite, zyklische Strukturen. Diese Rigidifizierung reduziert die Anzahl an Konformeren des Peptides und ermöglicht so die optimale Wechselwirkung am Wirkungsort des Sekundärmetaboliten. Des Weiteren schützt die

zyklische Struktur vor dem Abbau durch Peptidasen und gewährleistet eine gesteigerte Stabilität. Die große Mannigfaltigkeit der NRPS-Produkte lässt sich vornehmlich von der Diversität der verwendeten Bausteine ableiten. So können neben den proteinogenen Aminosäuren auch unnatürliche Aminosäuren, Fettsäuren, Zucker oder α -Hydroxysäuren eingebaut werden. In Abbildung 1.2 sind einige Vertreter der Klasse der iterativen NRPS Produkte dargestellt, wobei die repetitiven Sequenzen in grau unterlegt sind.

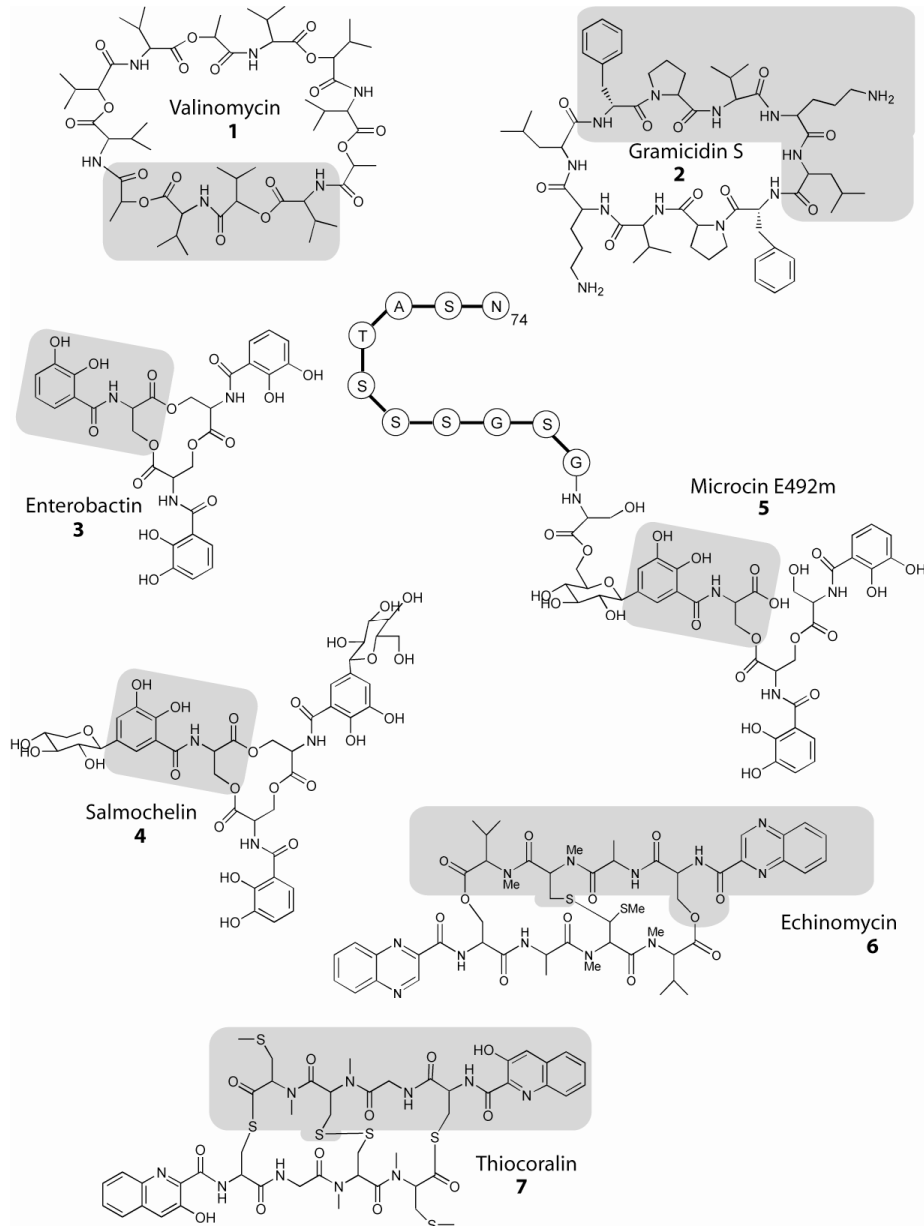


Abbildung 1.2: Iterative NRPS-Produkte. Bei Microcin E492m sind nur die 9 der insgesamt 84 Aminosäuren des ribosomal synthetisierten Peptides gezeigt. Grau unterlegt sind die repetitiven Sequenzen der iterativen Produkte dargestellt.

Ein interessanter Vertreter ist das Ionophor-Antibiotikum Valinomycin **1**, dessen zyklische Struktur sich aus abwechselnden α -Hydroxy- und α -Aminosäuren aufbaut [Cheng, 2006]. Das Antibiotikum Gramicidin S **2** ist hingegen ausschließlich aus Aminosäuren aufgebaut [Erlnager & Goode, 1954; Gauge & Brazhnikova, 1944]. Die strukturelle Vielfalt der verwendeten Bausteine wird an dem Siderophor Enterobactin **3** deutlich, da es in verschiedenen Organismen unterschiedlich modifiziert wird. Durch C-Glykosylierung wird aus Enterobactin z. B. Salmochelin **4** [Fischbach *et al.*, 2005]. Ein außergewöhnliches Beispiel ist die Verknüpfung von ribosomalen mit nicht-ribosomalen Produkten wie sie bei Microcin E492m **5** beobachtet wird [Nolan & Walsh, 2008]. Eine eigene Unterart der iterativen NRPS-Produkte stellen die Chromodepsipeptide dar. Außergewöhnlich bei einigen Vertretern dieser Gruppe ist das Auftreten einer Disulfidbindung, so dass ein bizyklisches Produkt, wie Echinomycin **6** oder das Anti-Tumor-Mittel Thiocoralin **7**, entsteht [Lombo *et al.*, 2006; Watanabe *et al.*, 2006].

In den folgenden Abschnitten soll zunächst auf die Synthese von nicht-ribosomalen Peptiden eingegangen und anschließend die Unterteilung in linear, iterativ und nicht lineare NRPS erklärt werden.

1.2 Mechanismus der nicht-ribosomalen Peptidsynthese

Nicht-ribosomale Peptide werden an Synthetasen assembliert. Diese verknüpfen die einzelnen Bausteine in Form von Aminosäuren miteinander und synthetisieren so das Peptidgrundgerüst. Diese Synthetasen lassen sich in Module einteilen, wobei jedes Modul für den Einbau einer Aminosäure in das Produkt verantwortlich ist [Marahiel *et al.*, 1997]. Da die Module oftmals hintereinander wie ein Fließband angeordnet sind, spricht man von einem Fließband-Mechanismus. In Abbildung 1.3 ist dieses am Beispiel der Tyrocidin-Synthetase gezeigt [Mootz & Marahiel, 1997]. Die einzelnen Module lassen sich in unabhängige katalytische Domänen unterteilen, die die einzelnen Schritte, wie z. B. Aktivierung oder Kondensation, katalysieren. Drei essentielle Domänen, die Adenylierungs-, Peptidyl-Carrier-Protein- und Kondensationsdomäne, sind hierbei an der Synthese aller NRP beteiligt. Sie katalysieren die Selektion eines Bausteins und die Einbindung in die wachsende Peptidkette. In Abbildung 1.4 ist ein Überblick über diese Reaktionen gezeigt. Diese werden im Folgenden vorgestellt.

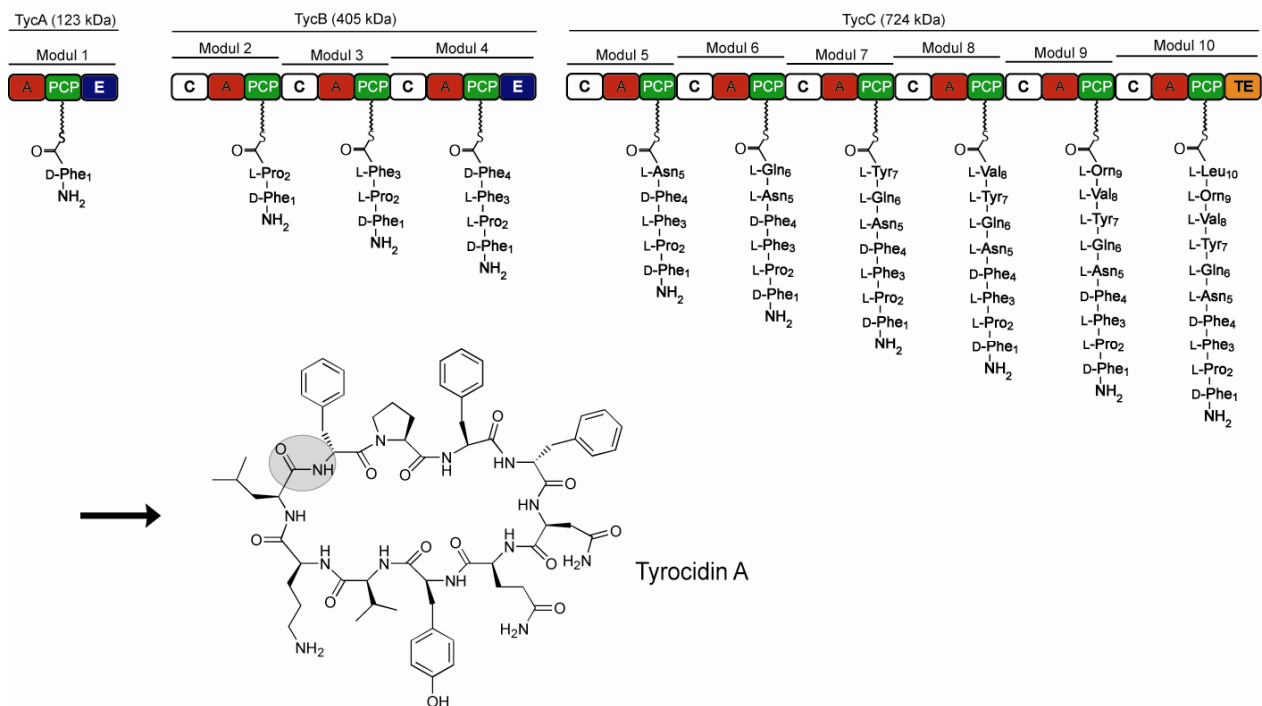


Abbildung 1.3: Fließband-Mechanismus der Tyrocidin A-Synthese. A = Adenylierungsdomäne; PCP = Peptidyl-Carrier-Protein-Domäne; C = Kondensationsdomäne; E = Epimerisierungsdomäne; TE = Thioesterase.

Die Adenylierungsdomäne (A-Domäne, ~500 Aminosäuren) selektiert im ersten Schritt eine Aminosäure aus dem Pool der möglichen Substrate und aktiviert diese mittels ATP (Abb. 1.4, Schritt 1) [Conti *et al.*, 1997; May *et al.*, 2002]. Durch die Strukturaufklärung der PheA A-Domäne des Gramicidin S-Systems konnte die Aminosäure-Bindungstasche bestimmt werden. Hieraus resultierte der aus zehn Aminosäuren zusammengesetzte sogenannte NRPS-Code, der eine allein auf der A-Domänen-Sequenz beruhende Vorhersage der Substratselektivität ermöglicht [Stachelhaus *et al.*, 1999]. Das von der A-Domäne gebildete Aminoacyl-AMP-Derivat wird anschließend auf den Phosphopantetheinylarm (Ppan-Arm) einer Peptidyl-Carrier-Protein-Domäne (PCP-Domäne, ~200 Aminosäuren) übertragen (Abb. 1.4, Schritt 2) [Stachelhaus *et al.*, 1996]. Der Ppan-Arm einer PCP-Domäne entsteht durch eine posttranslationale Modifikation, bei der die Phosphopantetheinylgruppe des Koenzym A auf ein konserviertes Serin der PCP-Domäne übertragen wird. Katalysiert wird dieser Schritt von einer Phosphopantetheinyltransferase [Lambalot *et al.*, 1996; Reuter *et al.*, 1999]. Dieser bewegliche Arm der PCP-Domäne wird zum Weiterreichen der Aminosäurebausteine von einem katalytischen Zentrum zum nächsten verwendet. Die Syntheseintermediate bleiben folglich

während der Assemblierung kovalent an der Synthetase gebunden. Da die Intermediate somit nicht frei diffundieren, wird die katalytische Effizienz gesteigert und Nebenprodukte werden minimiert.

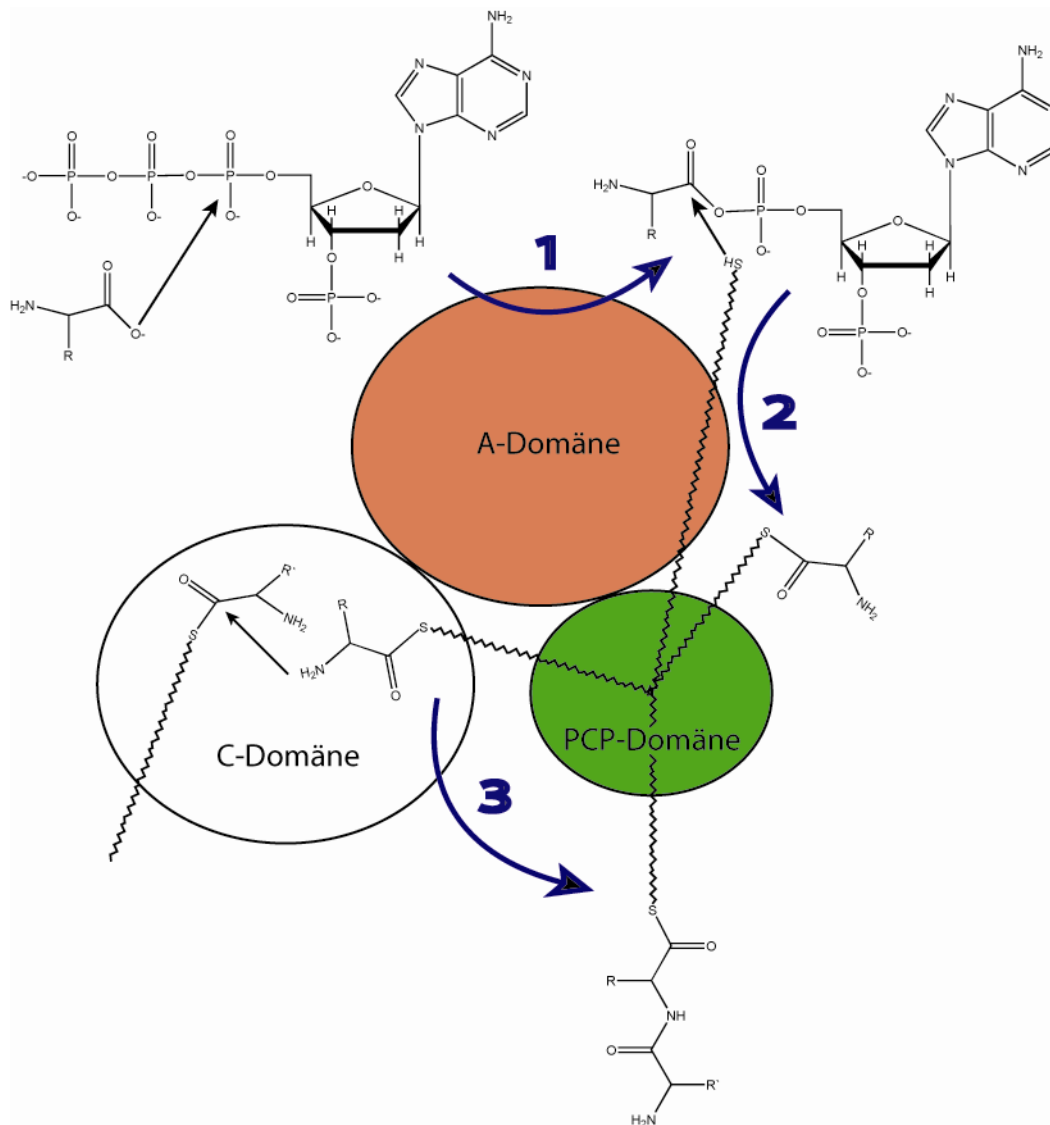


Abbildung 1.4: Reaktionen der drei essentiellen Domänen der nicht-ribosomalen Peptidsynthese.

A-Domäne = Adenylierungsdomäne; **PCP-Domäne** = Peptidyl-Carrier-Protein-Domäne;

C-Domäne = Kondensationsdomäne

Im nächsten Schritt reicht die PCP-Domäne den als Thioester gebundenen Baustein zur Kondensationsdomäne weiter (C-Domäne ~450 Aminosäuren) [Bergendahl *et al.*, 2002; Stachelhaus *et al.*, 1998]. Diese katalysiert anschließend die Bildung einer Amidbindung zwischen dem neuen Baustein und der wachsenden Peptidkette, die auf der abwärts liegenden PCP-Domäne gebunden ist (Abb. 1.4, Schritt 3). Für die Katalyse dieses Schrittes scheint zum

einen die Positionierung der Substrate sowie ein Histidinrest im aktiven Zentrum der C-Domäne zur Steigerung der katalytischen Effizienz entscheidend zu sein [Samel *et al.*, 2007]. Die Freisetzung des Peptides von der Synthetase erfolgt in den meisten Fällen durch eine Thioesterase-Domäne (TE-Domäne ~280 Aminosäuren) [Sattely *et al.*, 2008]. Auf die TE-Domäne wird im Kapitel 1.3 genauer eingegangen, da sie eine zentrale Position innerhalb dieser Arbeit einnimmt. Weitere Domänen, die eine Abspaltung des Peptides von der Synthetase katalysieren können, sind zum Einen die Kondensationsdomäne, wie es im Falle der Cyclosporin-Synthetase vermutet wird, und zum anderen eine Reduktasedomäne (R-Domäne ~350 Aminosäuren), wie bei der Gramicidin A- und Nostocyclopeptid-Synthetase [Kopp *et al.*, 2006; Schracke *et al.*, 2005].

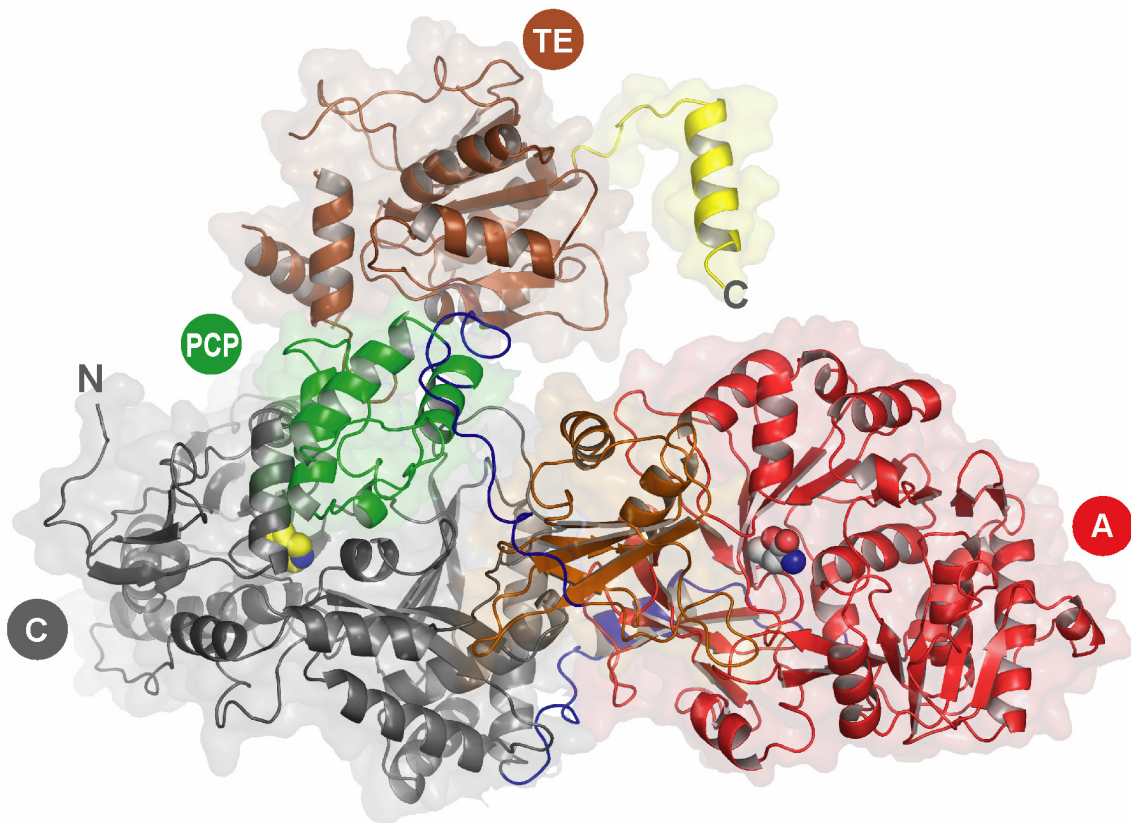


Abbildung 1.5: Kristallstruktur des Terminationsmoduls der Surfactin-Synthetase. Die Kondensationsdomäne (C) ist in grau, die Adenylierungsdomäne (A) in rot, die PCP-Domäne (PCP) in grün und die TE-Domäne (TE) in braun dargestellt [Tanovic *et al.*, 2008].

Die Struktur eines kompletten Moduls einer nicht-ribosomalen Peptidsynthetase konnte erst kürzlich gelöst werden. Hieraus lässt sich die Anordnung der einzelnen Module zueinander

vermuten und die Anordnung der einzelnen Domänen innerhalb eines Moduls zeigen (Abb. 1.5) [Tanovic *et al.*, 2008].

1.3 Die Thioesterase

Die biochemische Charakterisierung einer iterativen Thioesterase ist Hauptbestandteil dieser Arbeit. Da über die Funktion von iterativen Thioesterasen vor dieser Arbeit nur wenig bekannt war, soll zunächst der allgemeine Mechanismus und die Funktion von Thioesterasen dargestellt werden.

Typ I-Thioesterasen katalysieren den letzten Schritt der nicht-ribosomalen Peptidsynthese. Hierbei kann es sich um eine Seitenkettenzyklisierung wie bei der Surfactin-Synthese, um eine Kopf-Schwanz-Zyklisierung wie in der Tyrocidin-Synthese oder aber auch um eine hydrolytische Freisetzung des Produktes wie bei der Vancomycin-Synthese handeln [Hubbard & Walsh, 2003; Trauger *et al.*, 2000; Tseng *et al.*, 2002]. Seltener wird auch eine C-C Bindungsknüpfung durch eine Thioesterase katalysiert. In der Terrequinone-Biosynthese wird vermutet, dass die Thioesterase eine Claisen-Kondensation katalysiert [Balibar *et al.*, 2007]. Eine weitere eigene Funktion übernehmen die Thioesterasen in iterativen Systemen. Sie katalysieren hier neben der Zyklisierung auch eine Oligomerisierung [Shaw-Reid *et al.*, 1999].

Neben der kürzlich veröffentlichten Struktur eines NRPS-Moduls konnten auch die Kristallstrukturen zweier TE-Domänen Aufschluss über deren Mechanismus geben [Bruner *et al.*, 2002; Samel *et al.*, 2006; Tanovic *et al.*, 2008]. Thioesterasen gehören zur Familie der α/β -Hydrolasen. Als Besonderheit gegenüber anderen Enzymen dieser Familie lässt sich eine Insertion von drei α -Helices beobachten. Dieser sogenannten Lid-Region wird eine Bedeutung bei der Substraterkennung und bei der Zurückhaltung von falschen Substraten zugesprochen [Bruner *et al.*, 2002]. Ausgehend von der Kristallstruktur der Surfactin-Thioesterase wurde eine Bewegung dieser Lid-Region bei der Substratbindung vorhergesagt, so dass es eine geschlossene und offene Form der katalytischen Tasche gibt [Bruner *et al.*, 2002]. Im Gegensatz hierzu besitzt die Fengycin-Thioesterase eher ein offenes *Canyon*-artiges katalytisches Zentrum [Samel *et al.*, 2006]. Alle Thioesterasen zeichnen sich durch eine katalytische Triade bestehend aus Serin, Asparagin (Glutamat) und Histidin aus [Bruner *et al.*, 2002]. Hierbei fungiert Serin als Nukleophil, dessen Aktivität durch die basischen Seitenkettenreste des Asparagin und Histidin gesteigert wird. Der erste Schritt der Thioesterasen-katalysierten Reaktion ist die Übertragung des C-terminalen Ppan-PCP-gebundenen Peptides auf das aktive Serin der TE-Domäne.

Anschließend erfolgt eine Zyklisierung oder eine Hydrolyse mit einem entsprechenden Nukleophil.

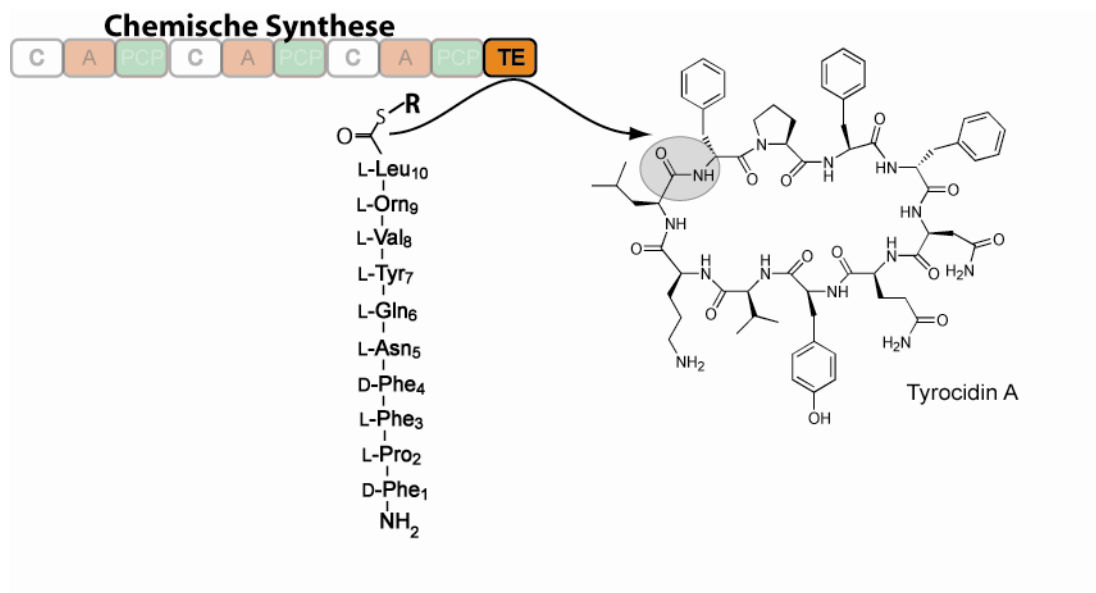


Abbildung 1.6: Chemoenzymatische Synthese gezeigt am Beispiel von Tyrocidin A. Die durch die TE-Domäne geknüpfte Bindung ist in grau unterlegt. R = häufig werden SNAC oder Thiophenol als Abgangsgruppe verwendet.

Bei der Synthese von zyklischen Peptiden ist zumeist die razemisierungsfreie und regioselektive Zyklisierung der schwierigste und ausbeutenlimitierende Schritt [Davies, 2003]. Dieses führte zu der Idee einzelständige Thioesterasen zur Katalyse genau dieser Reaktionen zu verwenden (Abb. 1.6) [Grunewald & Marahiel, 2006]. In diesen Ansätzen wird über Festphasenpeptidsynthese oder auch organische Synthese das lineare Vorläuferpeptid dargestellt. Anschließend erfolgt eine Aktivierung des C-Terminus über einen Thioester. Da das natürliche Substrat einer TE-Domäne das Ppan-gebundene Peptid ist, wird oft N-Acetylcysteamin (SNAC) als Nachahmung dieses Ppan-Armes verwendet [Trauger *et al.*, 2000]. Häufig wird auch das reaktivere Thiophenol als Abgangsgruppe gewählt [Sieber *et al.*, 2004]. Diese Substrate werden mit einer aus dem Enzymverbund gelösten Thioesterase inkubiert und dadurch zyklisiert. Die Verwendung dieses chemoenzymatischen Ansatzes hat in vielen Fällen zu neuen Sekundärmetabolitderivaten und einem tieferen Verständnis der Selektivität von Thioesterasen geführt [Kopp & Marahiel, 2007]. So konnte für viele Thioesterasen gezeigt werden, dass die Stereoselektivität der an der Peptidbindungsknüpfung beteiligten Aminosäuren für die

Zyklisierung essentiell ist. Weiter von dieser Position entfernte Aminosäuren können hingegen oft ausgetauscht werden, ohne die Zyklisierungsaktivität der Thioesterase zu blockieren.

1.4 Klassifizierung der NRPS

Hauptaugenmerk dieser Arbeit liegt auf iterativen NRPS-Systemen. Im folgenden Kapitel sollen die Unterschiede von iterativen zu linearen und nicht linearen Systemen veranschaulicht werden. Die Einteilung der NRPS in unterschiedliche Systeme erfolgt aufgrund der Domänenabfolge und der Reihenfolge einzelner Reaktionen zum Aufbau des Peptidgerüsts [Mootz *et al.*, 2002].

Lineare NRPS (Typ A)

Die bisher am Besten verstandene und untersuchte NRPS entspricht der linearen NRPS. In diesem Fall findet man das gängige Elongationsmodul C-A-PCP, welches eine Aminosäure in die wachsende Peptidkette einbaut. In linearen NRPS entspricht die Reihenfolge und die Anzahl der Module der Sequenz der linearen Peptidkette. Am Ende der Synthese erfolgt eine Zyklisierung, Hydrolyse oder auch Reduktion, die zur Freisetzung des Peptides führt. Eine typische lineare NRPS setzt sich also aus n Modulen für n Aminosäuren in der Peptidkette zusammen. Beispiele hierfür sind die Synthese des Lipidantibiotikums Daptomycin [Miao *et al.*, 2005] oder die bereits gezeigte Synthese des Tyrocidins (Abb. 1.2). Ein Nachteil der linearen NRPS kann die teilweise beachtliche Größe der Synthetasen sein. So ist die, aus einer Peptidkette bestehende, Cyclosporin-Synthetase 1,6 MDa groß [Weber *et al.*, 1994].

Iterative NRPS (Typ B)

Iterative NRPS nutzen im Gegensatz zu linearen NRPS ihre Module mehrmals zum Aufbau eines Produktes. Die Anordnung der einzelnen Module erfolgt in einer linearen Version. Kernstück der iterativen NRPS ist daher das Terminationsmodul, das die Verknüpfung der repetitiven Einheiten sowie die Freisetzung von der NRPS katalysiert. Diese Reaktion wird in Abschnitt 1.5 eingehender beschrieben. NRPS, die ausschließlich einzelne Domänen oder Module mehrmals benutzen, werden den nicht linearen NRPS-Systemen zugesprochen, da die Reihenfolge der Reaktionen nicht linear erfolgt. Beispiele für iterative NRPS sind neben den NRPS für die in Abschnitt 1.1 beschriebenen iterativen Produkte die Echinomycin- (Abb. 1.7) und die Montanastatin-Synthetase [Pettit *et al.*, 1999; Watanabe *et al.*, 2006].

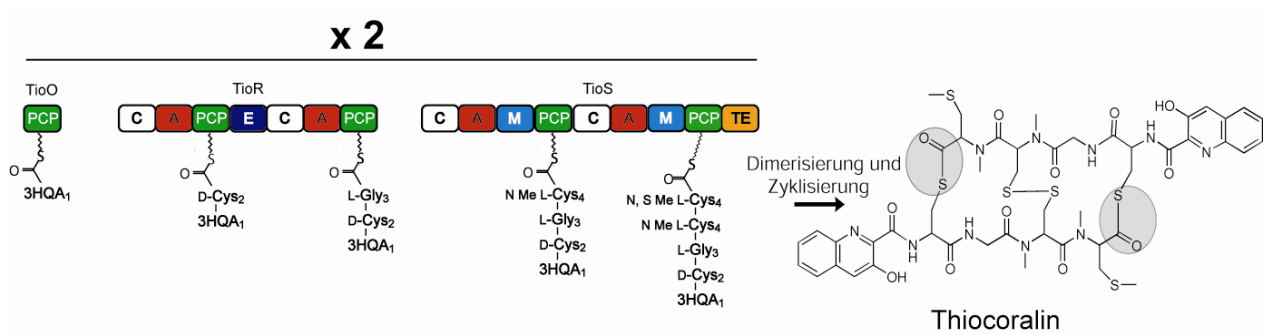


Abbildung 1.7: Iterative NRP-Synthese gezeigt am Beispiel von Thiocoralin. A = Adenylierungsdomäne; PCP = Peptidyl-Carrier-Protein-Domäne; C = Kondensationsdomäne; E = Epimerisierungsdomäne; TE = Thioesterase; M = Methylierungsdomäne.

Nicht-lineare NRPS (Typ C)

Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Systemen lässt sich das Produkt der nicht linearen NRPS so wie dessen Synthese oft nicht anhand der Synthetasenanzahl und Domänenanordnung ableiten. Ein Beispiel ist die kürzlich sequenzierte Synthetase des Siderophors Fuscachelin (Abb. 1.8) [Dimise *et al.*, 2008]. Die Struktur des Produktes und die Anzahl der Module lässt hier nur vermuten wie die Biosynthese abläuft (Abb. 1.8). Die ersten Synthetasen (FscC, FscF und FscG) werden iterativ verwendet, wohingegen die beiden Synthetasen FscH und FscI nur einmal für den Aufbau des Produktes benötigt werden. Dimise *et al.* schlugen daher Biosyntheseweg a) vor, in dem die Kondensationsdomäne des Terminationsmoduls zwei unterschiedliche Reaktionen katalysiert. Dies ist zum einen die Verknüpfung des δ -N-Atoms des Ornithins mit dem C-Terminus eines Pentapeptides und die Verknüpfung der α -Aminogruppe des Ornithins mit dem C-Terminus eines zweiten Tetrapeptides. Anschließend katalysiert die Thioesterase eine Zyklisierung. Eine weitere Möglichkeit ist Weg b), in dem die Thioesterase zwei Substrate von zwei unterschiedlichen Synthetasen (FscH und FscI) ligiert. Hierbei müsste die Thioesterase die Seitenketten Nukleophile des Serins und des Ornithins mit dem C-Terminus eines Peptides verknüpfen (Abb. 1.8).

Dieses Beispiel macht deutlich, dass es in nicht linearen NRPS-Systemen ohne die Struktur des Produktes und/ oder biochemische Charakterisierung der beteiligten Enzyme nicht möglich ist, die Biosynthese vorherzusagen. Andere Beispiele sind die NRPS des Siderophors Coelichelin [Challis & Ravel, 2000; Pohlmann & Marahiel, 2008] und von Syringomycin [Guenzi *et al.*, 1998].

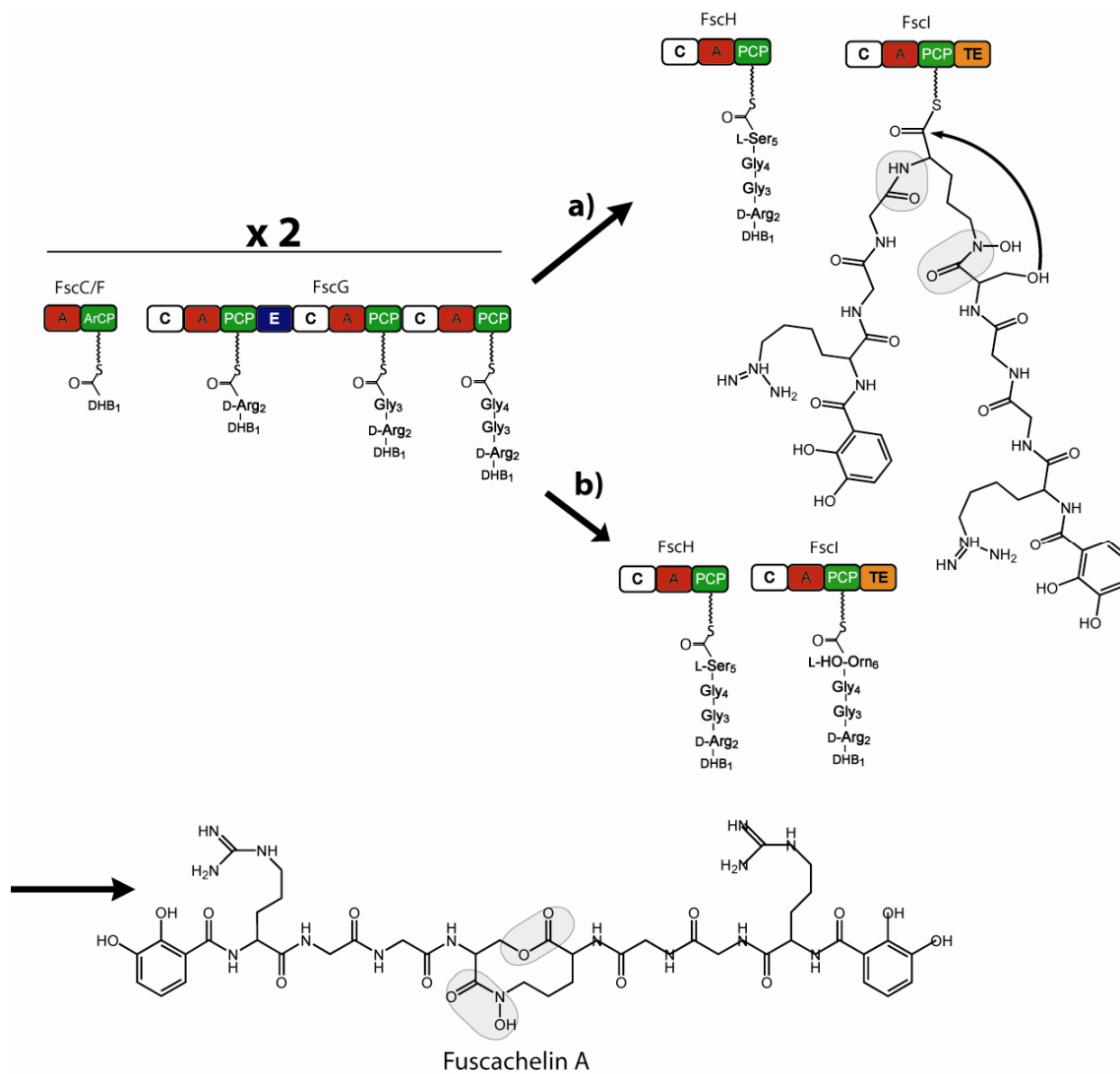


Abbildung 1.8: Nicht-ribosomale Synthese von Fuscachelin A. Die Synthetasen FscC/ F/ G werden iterativ verwendet. Weg a) und b) zeigen die möglichen Folgeschritte. A = Adenylierungsdomäne; PCP = Peptidyl-Carrier-Protein-Domäne; C = Kondensationsdomäne; E = Epimerisierungsdomäne; TE = Thioesterase .

1.5 Terminationsstrategien der iterativen NRPS

Im vorangegangenen Abschnitt wurden bereits die wesentlichen Grundzüge der iterativen NRPS erläutert. Hierbei wird deutlich, dass der entscheidende und außergewöhnliche Schritt der iterativen NRPS die Terminationsreaktion ist. In diesem Schritt müssen zwei chemisch identische Reaktionen katalysiert werden. Die Ligation zweier oder mehrerer Monomereinheiten und die anschließende Zyklisierung und Freisetzung von der Synthetase. In vielen iterativen NRPS findet man eine endständige Thioesterasedomäne die beide Reaktionen katalysiert. Ein anderes Modell,

laut dem der Ligations- und der Zyklisierungsschritt von zwei miteinander interagierenden Synthetasen katalysiert wird, kann mittlerweile weitestgehend ausgeschlossen werden. Zum Einen konnte für diverse NRPS bakteriellen Ursprungs gezeigt werden, dass sie als Monomer vorliegen [Sieber *et al.*, 2002]. Des Weiteren zeigten frühe Untersuchungen am Enterobactin-System, dass zur Assemblierung des Trilactons nur eine Synthetase benötigt wird [Gehring *et al.*, 1998]. Ausgehend hiervon wurde vermutet, dass die Thioesterasedomäne die Elongation und die Zyklisierung katalysiert. Den ersten Beweis hierfür lieferte die massenspektrometrische Untersuchung der Terminationsreaktion der Enterobactin-Synthetase [Shaw-Reid *et al.*, 1999]. Das *Escherichia coli* Siderophor Enterobactin besteht aus drei identischen Monomereinheiten, die über Laktonisierung miteinander verbunden sind. Jedes dieser Monomere besteht aus den Bausteinen 2,3-Dihydroxybenzoat und Serin. Über die Seitenkette des Serins kommt es zur Verknüpfung mit der Carboxyfunktion des zweiten Serins von einem zweiten Monomer. Durch die Mutation des zur katalytischen Triade gehörenden Histidins zu Alanin konnte die Reaktion der Thioesterase verlangsamt werden und so ein TE-gebundenes Monomer und Dimer massenspektrometrisch identifiziert werden. Ausgehend hiervon wurde postuliert, dass zunächst ein Monomer von der Synthetase hergestellt und auf die TE-Domäne übertragen wird (Abb. 1.9). Dort verharrt dieses Monomer, bis ein zweites Monomer synthetisiert wurde und auf der benachbarten PCP-Domäne präsentiert wird. Anschließend katalysiert die TE-Domäne die Ligation der beiden Monomere. Nach Wiederholung dieses Schrittes erfolgt als letzter Schritt die TE-Domänen-katalysierte Zyklisierung und Freisetzung des Enterobactins. Diese iterative Thioesterase katalysiert demzufolge eine Trilaktonisierung über ein Seitenkettenukleophil. Bei der Synthese der Ionophore Valinomycin (Abb. 1.2) und Cereulide wird hingegen vermutet, dass die iterative Thioesterase die Trilaktonisierung über die Hydroxygruppe der α -Hydroxy-Isovaleriansäure katalysiert [Cheng, 2006; Ehling-Schulz *et al.*, 2006]. Die Peptidbindungsknüpfung durch eine iterative Thioesterase kann hingegen in der Biosynthese des Antibiotikums Gramacidin S (Abb. 1.2) beobachtet werden.

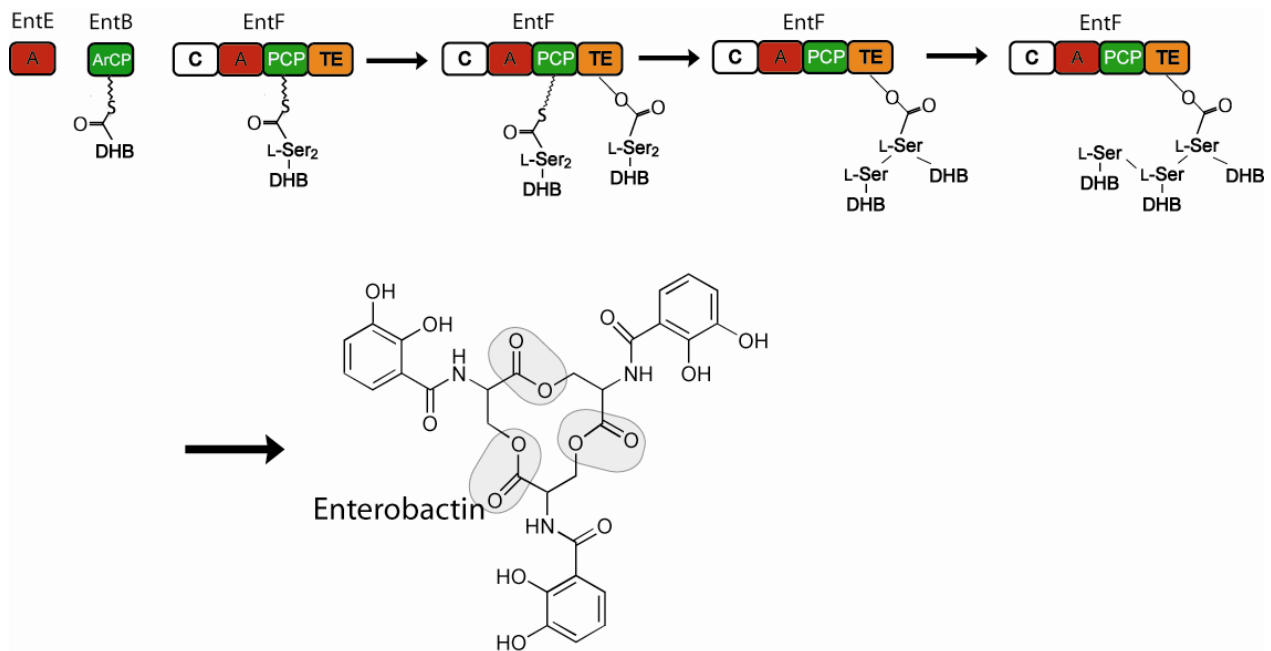


Abbildung 1.9: Mechanismus der Enterobactin-Synthese [Shaw-Reid *et al.*, 1999]. A = Adenylierungsdomäne; PCP = Peptidyl-Carrier-Protein-Domäne; C = Kondensationsdomäne; TE = Thioesterase; ArCP = Aryl-Carrier-Protein-Domäne;.

Im Gegensatz zu den meisten bakteriellen NRPS nutzen viele fungale NRPS anstatt der Thioesterasedomäne eine Kondensationsdomäne. So wird die Zyklisierung des Immunosuppressiva Cyclosporin wahrscheinlich durch eine Kondensationsdomäne katalysiert [Weber *et al.*, 1994]. Dieses Phänomen kann auch in einigen iterativen NRPS-Systemen beobachtet werden. Der iterative Mechanismus in diesen Systemen ist allerdings bisher so gut wie gar nicht untersucht worden. Ein Beispiel hierfür ist die Synthese von Enniatin. Bei Enniatin handelt es sich um ein N-methyliertes zyklisches Hexadepsipeptid, das von *Fusarium* Arten produziert wird [Tomoda *et al.*, 1992]. Abbildung 1.10 zeigt die iterative NRPS. Auch hier konnte gezeigt werden, dass die Oligomerisierung und die Zyklisierung an einer einzigen Synthetase katalysiert werden [Glinski *et al.*, 2002]. Iterativen Synthetasen, die eine C-Domäne anstelle einer TE-Domäne verwenden, besitzen eine zusätzliche PCP-Domäne im Terminationsmodul (Abb. 1.10). Hier kann man vermuten, dass diese zusätzliche PCP-Domäne als Halteposition für das erste Monomer fungiert, während das zweite Monomer synthetisiert wird und anschließend auf der benachbarten PCP-Domäne präsentiert wird (Abb. 1.10). Diese Funktion wird hier benötigt, da im Gegensatz zur TE-Domäne bei der C-Domäne das Monomer während der Katalyse nicht kovalent gebunden vorliegt. Ein weiterer Unterschied zwischen

diesen Systemen besteht darin, dass eine zusätzliche C-Domäne am N-terminalen Ende des Initiationsmoduls zu finden ist. Ob allerdings diese Domäne an der Elongation oder Zyklisierung beteiligt ist, konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden. Dagegen spricht, dass man im Beauvericin-System eine N-terminale Kondensationsdomäne findet, der das zweite Histidin in der Core-Sequenz fehlt (HLxxxD) [Xu *et al.*, 2008]. Dieses Histidin ist allerdings oft für die katalytische Effizienz entscheidend [Bergendahl *et al.*, 2002; Samel *et al.*, 2007; Stachelhaus *et al.*, 1998].

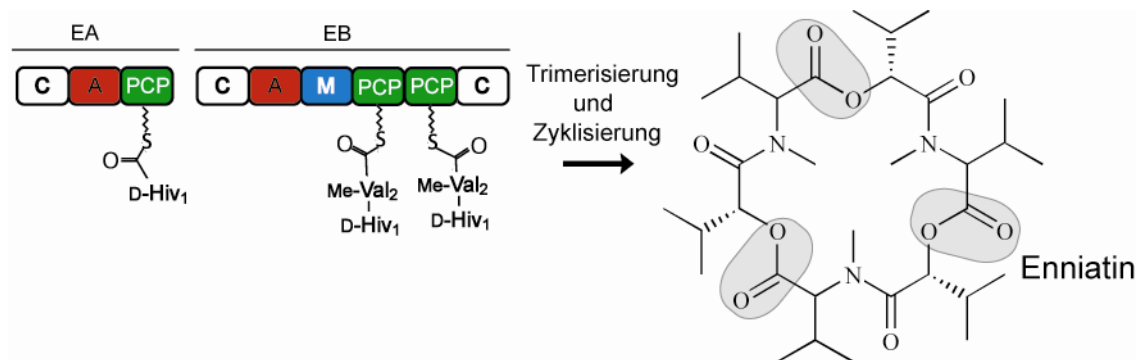


Abbildung 1.10: Enniatin-Synthese. A = Adenylierungsdomäne; PCP = Peptidyl-Carrier-Protein-Domäne; C = Kondensationsdomäne; M = Methylierungsdomäne.

1.6 Das Peptidantibiotikum Gramicidin S

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Terminationsreaktion der iterativen Gramicidin S Synthetase charakterisiert werden. Im Folgendem wird ein kurzer Überblick über Gramicidin S und seine Biosynthese gegeben.

1.6.1 Struktur und Wirkungsmechanismus von Gramicidin S

Gramicidin S gehört zur Klasse der membranaktiven Peptidantibiotika. Diese Klasse zeichnet sich durch rigide Strukturen (α -Helikal, β -Faltblatt) und einen amphipatischen Charakter aus, um mit der prokaryotischen Membran wechselwirken zu können. Eine Ausnahme hierzu ist z. B. Gramicidin A, das eine β -helikale Struktur aufweist und ausschließlich aus hydrophoben Aminosäuren aufgebaut ist. Bei Gramicidin S (GS) handelt es sich um ein zyklisches Dekapeptid, das aus zwei repetitiven Pentapeptiden der Sequenz D-Phe-Pro-Val-Orn-Leu aufgebaut ist. GS besitzt eine antiparallele β -Faltblatt Struktur mit einer hydrophoben und einer hydrophilen Seite (Abb. 1.12).

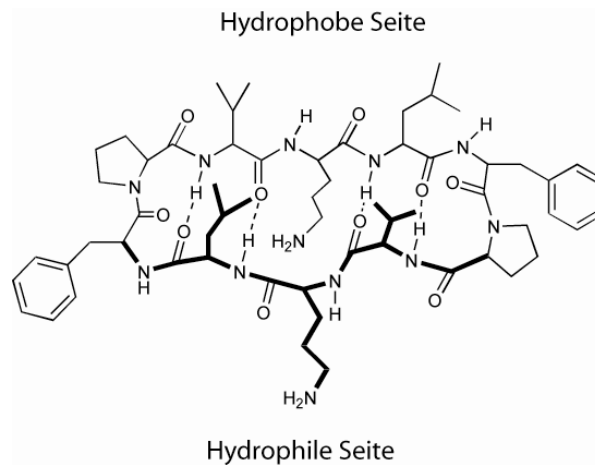


Abbildung 1.12: β -Faltblattstruktur von Gramicidin S.

Hierbei sind die Aminosäuren Val, Orn- und Leu maßgeblich an der β -Faltblattstruktur beteiligt, wohingegen D-Phe und Pro eine β -Wendung des Typs II bilden. Diese rigide zyklische Struktur ermöglicht die Interaktion mit Membranen. Untersuchungen mit ^{19}F -markiertem GS zeigten, dass sich das Molekül zunächst flach an die Membran setzt, wobei die positiv geladenen Ornithin-Reste mit den negativ geladenen Köpfen der Phospholipide interagieren, während der hydrophobe Teil von GS mit den Kohlenstoffketten der Phospholipide wechselwirkt [Salgado *et al.*, 2001]. Aktuelle Untersuchungen der Interaktion von GS mit Membranen zeigen, dass GS keine klar definierten Ionenkanäle in der Membran bildet, sondern die Membran durch verschiedenartige Störungen permeabilisiert [Ashrafuzzaman *et al.*, 2008]. Aufgrund dieser Eigenschaften ist GS ein starkes Antibiotikum, das gegen ein breites Spektrum an Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien aktiv ist. GS besitzt jedoch auch hämolytische Eigenschaften, so dass nur eine äußere Anwendung als Antibiotikum beim Menschen möglich ist. In den letzten Jahren gab und gibt es daher ein stetiges Interesse daran neue GS Varianten zu synthetisieren, die immer noch ihre antibiotischen Eigenschaften haben, jedoch eine geringere oder keine hämolytische Aktivität. Erste Erfolge konnten z. B. durch die Veränderung der Ringgröße oder der enantiomeren Konformation einzelner Aminosäuren erreicht werden [Jelokhani-Niaraki *et al.*, 2000; Kondejewski *et al.*, 1996; Kondejewski *et al.*, 1999; Kondejewski *et al.*, 2002].

1.6.2 Biosynthese von Gramicidin S

Gramicidin S konnte erstmals in den 40er Jahren aus dem Bodenbakterium *Bacillus brevis* isoliert werden [Gauge & Brazhnikova, 1944]. Es wird an zwei nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen, GrsA und GrsB, synthetisiert (Abb. 1.13) [Kratzschmar *et al.*, 1989].

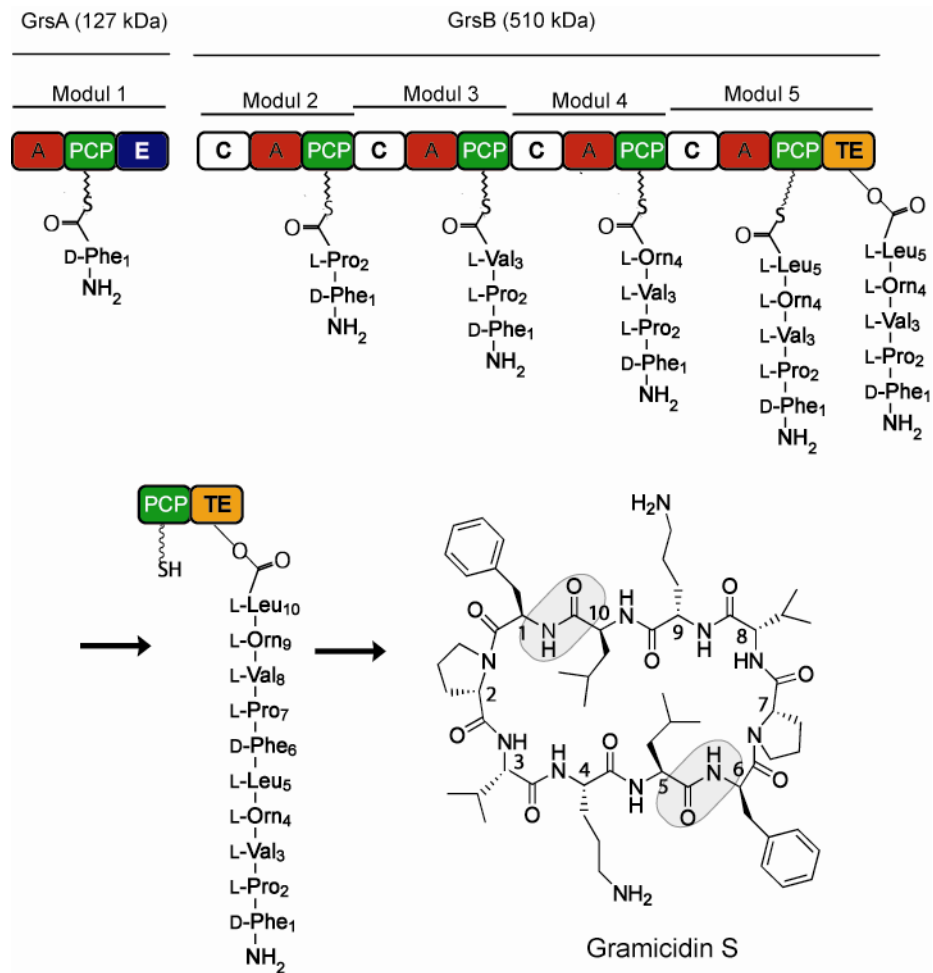


Abbildung 1.12: Nicht-ribosomale Peptidsynthese von Gramicidin S. A = Adenylierungsdomäne; PCP = Peptidyl-Carrier-Protein-Domäne; C = Kondensationsdomäne; E = Epimerisierungsdomäne; TE = Thioesterase.

Da die Synthetasen nur fünf Module kodieren, Gramicidin S jedoch aus einem symmetrischen Dekapeptid aufgebaut ist, wurde schon früh ein iterativer Mechanismus postuliert. So ließen erste Versuche in den 70er Jahren mit den aus dem Produzentenstamm gereinigten Synthetasen darauf schließen, dass die Synthese an einer Synthetase und nicht an einem Synthetasen-Dimer abläuft [Stoll *et al.*, 1970]. In diesen Versuchen wurde die Synthetase sowohl mit ^{14}C -markierter

Azetidin-2-Carbonsäure als auch in einem zweiten Versuch mit ^3H -markierten Prolin beladen. Anschließend wurden beide Protein-Chargen miteinander, sowie den weiteren für die Biosynthese benötigten Aminosäuren und ATP inkubiert. Die Analyse des gebildeten Gramacidin S zeigte vornehmlich, dass es nur eine Markierung trägt. Es wurde daher schon damals vermutet, dass als letzter Schritt die beiden Pentapeptid-Monomere an einer Synthetase dimerisiert und zyklisiert werden.

1.7 Synthesestrategien für Bausteine der NRPS

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Synthese des Bausteins 3-Hydroxychinaldinsäure. Dieser wird in das iterative NRPS-Produkt Thiocoralin eingebaut. Daher sollen zunächst im folgenden Kapitel die wesentlichen Synthesestrategien, die für die Bausteinsynthese in NRPS-Systemen verwendet werden, dargestellt werden. In den nachfolgenden Kapiteln wird dann das Peptid Thiocoralin eingehender beschrieben und die postulierte Biosynthese von Thiocoralin aufgezeigt.

Nicht-ribosomale Peptide zeichnen sich durch ihre große Mannigfaltigkeit aus, die weitestgehend auf der Diversität ihrer Bausteine beruht. Die nicht-proteinogenen Bausteine sind oft auch für die biologische Aktivität des Sekundärmetaboliten entscheidend. So sind derzeit über 350 nicht-proteinogene Aminosäuren bekannt, die durch NRPS in Sekundärmetaboliten eingebaut werden [Caboche *et al.*, 2008]. Weiterhin werden viele NRPS-Produkte auch nach der Abspaltung von der Synthetase modifiziert. So werden z. B. Zuckermoleküle, wie bei den Glykopeptiden der Vancomycin-Familie (Abb. 1.11) oder dem Siderophor Salmochelin (Abb. 1.2), an das fertige Peptidrückgrat addiert [Fischbach *et al.*, 2005; Kahne *et al.*, 2005]. Weitere häufige Post-NRPS-Modifizierungen sind Oxidationen, wie z. B. in der Biosynthese des Penicillins [Roach *et al.*, 1997]. Neben den postsynthetischen Modifikationen verwendet die Natur viele Reaktionen, um aus den Produkten des Primärmetabolismus neue Bausteine für die NRP-Synthese zu generieren. Im Wesentlichen gibt es hierbei zwei Strategien: Die Bausteinsynthese findet vor der Assemblierung des Peptidrückgrates an der NRPS statt oder die Modifizierung der Bausteine erfolgt während der Assemblierung.

Bausteinsynthese vor der Assemblierung

Ein Beispiel für diese Strategie ist die Synthese von Bausteinen der Glykopeptid-Antibiotika [Sattely *et al.*, 2008]. Der Baustein β -Hydroxytyrosin wird durch die β -Hydroxylierung von PCP-

gebundenem Tyrosin synthetisiert, wohingegen 3,5-Dihydroxyphenylglycin über nicht-PCP-gebundene Intermediate gebildet wird (Abb. 1.11). Es wird aus vier Einheiten Malonyl-CoA gebildet. Zunächst verknüpft eine Typ II PKS diese zu Dihydroxyphenylacetyl-CoA. Dann katalysiert eine Dioxygenase die Oxidation zu Dihydroxyphenylglyoxylat, bevor eine Transaminierung zum Endprodukt führt.

Bei der Bausteinsynthese vor der Assemblierung durch die NRPS können auch Enzyme des Primärmetabolismus eingebunden sein. So konnte bei der Synthese von 3-Me-Glutamat, einem Baustein von CDA, gezeigt werden, dass IlvE, ein Enzym des Primärmetabolismus, die Transaminierung von 3-Methyl-2-Oxoglutarat katalysiert (Abb. 1.11) [Mahlert *et al.*, 2007].

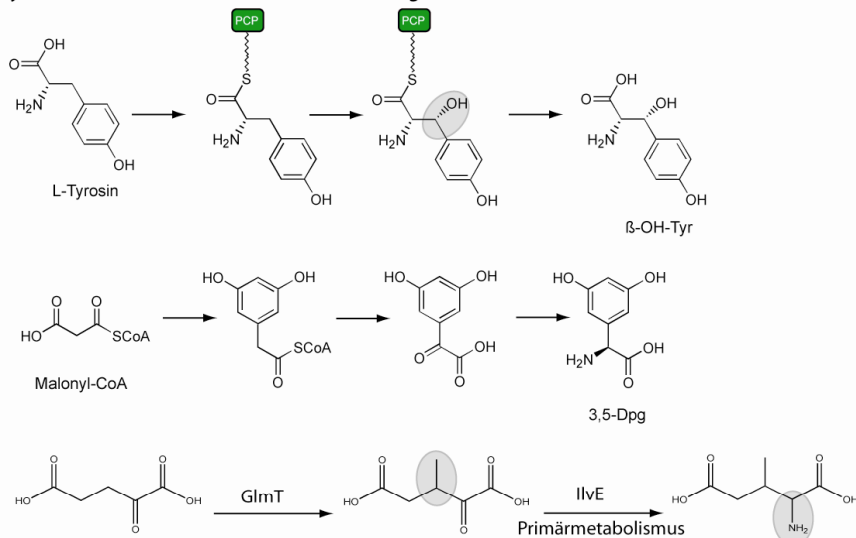
Modifizierung von Bausteinen während der Assemblierung

Bei der Modifizierung von Bausteinen während der Assemblierung unterscheidet man zwischen *in cis* arbeitenden Domänen der NRPS und *in trans* arbeitenden Enzymen, die PCP-gebundene Substrate umsetzen. Beispiele für *in cis* arbeitende Domänen sind die sehr häufig auftretenden N-Methylierungsdomänen [Schauwecker *et al.*, 2000] und die erst kürzlich eingehend charakterisierten Epimerisierungsdomänen (Abb. 1.11) [Stein *et al.*, 2006; Stein *et al.*, 2005]. Weiterhin findet man häufig Zyklisierungsdomänen, wie bei der Biosynthese von Bacitracin [Duerfahrt *et al.*, 2004]. Beispiele für *in trans* arbeitende Enzyme sind die Oxygenasen der Vancomycin Familie (Abb. 1.11) [Woithe *et al.*, 2007].

Die Vorhersage, an welchem Punkt der Biosynthese die modifizierenden Enzyme eingreifen, ist hierbei oft sehr schwierig.

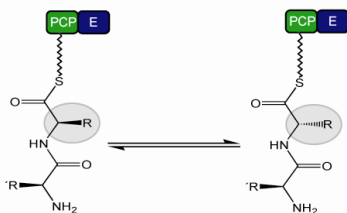
Ein weiterer wichtiger Punkt der Bausteinbiosynthese ist ihre Regulierung. Diese stellt sicher, dass keine Energie für die Biosynthese von nicht benötigten Bausteinen verwendet wird, nicht zu viele Primärstoffwechselprodukte entzogen werden und keine höhere Konzentration von z. B. nicht-proteinogenen Aminosäuren in der Zelle erzeugt wird. Deshalb befinden sich die Gene der Enzyme, die an der Bausteinbiosynthese beteiligt sind, fast immer im Biosynthesecluster des Sekundärmetaboliten. Gerade bei der Bausteinsynthese die vor der Assemblierung des Peptidgrundgerüsts durch die NRPS abläuft, scheint eine stringente Kontrolle der Synthese entscheidend zu sein. Daher wird vermutet, dass die Regulierung hier durch eine geringe katalytische Effizienz dieser Enzyme stattfindet [Samel *et al.*, 2008].

Synthese von Bausteinen vor der Assemblierung durch NRPS

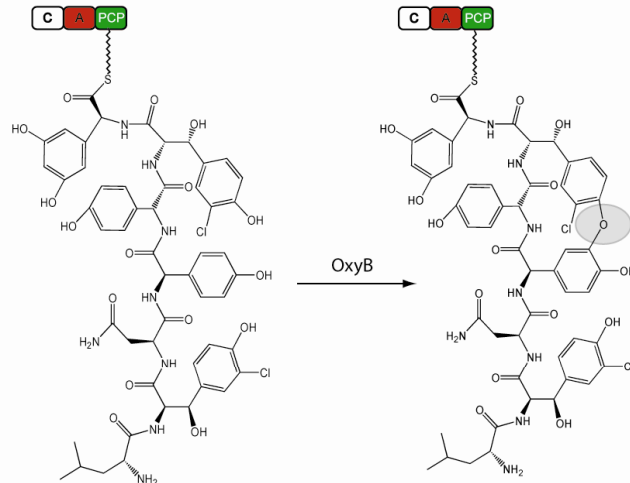


Modifizierungen während der Assemblierung des Peptidgrundgerütes

a) Durch *in cis* arbeitende Enzyme



b) Durch *in trans* arbeitende Enzyme



Modifizierungen am Peptidgrundgerüst

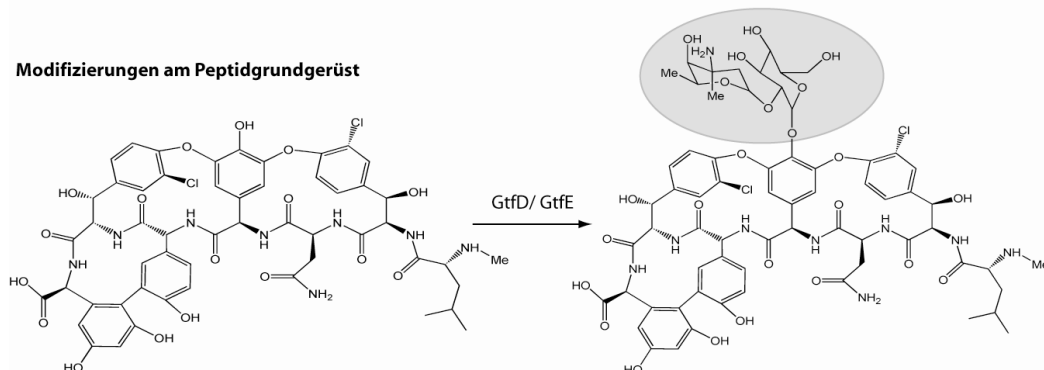


Abbildung 1.11: Strategien der Bausteinsynthese und post-synthetischen Modifizierungen der NRP-Synthese. β -OH-Tyr = β -Hydroxytyrosin; 3,5-Dpg = 3,5-Dihydroxyphenylglycin.

1.8 Das Chromodepsipeptid Thiocoralin

1.8.1 Struktur und Wirkungsmechanismus von Thiocoralin

Das nicht-ribosomale Peptid Thiocoralin gehört zur Klasse der bisinterkalativen Chromodepsipeptide [Dawson *et al.*, 2007]. Mitglieder dieser Substanzklasse weisen antitumorale, antivirale und antibiotische Eigenschaften auf. Die Wirkung beruht dabei zumeist auf der Fähigkeit an spezifische Sequenzen der DNA zu binden. Ermöglicht wird diese DNA-Bindung zum Einen durch die rigide zyklische Struktur und zum Anderen durch Chromophore, die mit den DNA-Basen interagieren [Watanabe, 2008]. Folglich sind diese strukturellen Merkmale bei allen Mitgliedern der bisinterkalativen Chromodepsipeptide zu finden. Als weiteres strukturelles Merkmal besitzen einige Vertreter dieser Substanzklasse eine Disulfidbrücke, wie z. B. Thiocoralin, Echinomycin und Triostin A. Interessanterweise trägt auch die Modifikation dieser Disulfidbrücke zur Selektivität bei. So besteht der einzige Unterschied zwischen Triostin A und Echinomycin in der Verbrückung der N-Methylcystein-Reste, was schon zu leicht unterschiedlichen Selektivitäten bezüglich der erkannten DNA-Sequenzen führt [Lee & Waring, 1978].

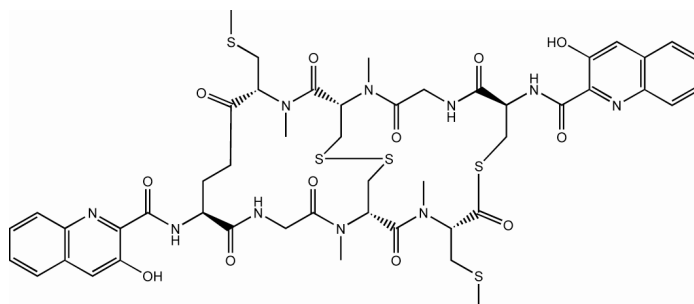


Abbildung 1.12: Thiocoralin.

Thiocoralin ist ein pseudosymmetrisches zyklisches Oktadepsipeptid, dessen repetitiven Einheiten über eine selten beobachtete Thioesterbindung verbunden sind (Abb. 1.12). Des Weiteren stabilisiert eine Disulfidbrücke die zyklische Struktur. An zwei gegenüberliegenden Seiten herausstehend befindet sich je ein Chromophor, die 3-Hydroxychinaldinsäure (3HQA). Als nicht-proteinogene Bausteine sind ein D-Cystein, ein N-Methylcystein und ein N,S-Dimethylcystein eingebaut. Die kürzlich veröffentlichte Röntgenstrukturanalyse von Thiocoralin zeigt eine gestapelte Anordnung der Moleküle in einem orthorhombischen Kristall (Abb. 1.13) [Negri *et al.*, 2007]. Deutlich wird hier die starre Form des Thiocoralins mit den zwei

Chromophoren, die in eine Richtung des Moleküls weisen. Jedes 3HQA-Chromophor ist zwischen zwei 3HQA's des Nachbarmoleküls angeordnet. Diese Interaktion entspricht im Wesentlichen der Interkalation, wie sie mit den DNA-Basen vermutet wird. Weiterhin nimmt Thiocoralin in dieser Struktur eine ähnliche Anordnung an, wie sie schon bei der Wechselwirkung von Chromodepsipeptiden mit DNA-Sequenzen beobachtet wurde. Aufgrund dieser Tatsache konnte ein Modell des Thiocoralins mit gebundenen DNA-Sequenzen aufgestellt werden (Abb. 1.14). In der resultierenden Struktur werden drei Stabilitätsmerkmale gefunden (i) Van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen dem schwefelreichen Teil des Peptides mit der kleinen Furche des DNA-Oligomers, (ii) π - π -Wechselwirkungen zwischen 3HQA und den DNA-Basen und (iii) Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Glycin und Guanin [Negri *et al.*, 2007].

Durch DNA-Footprinting-Experimente und DNA-Schmelzkurven konnte die Bindung des Thiocoralins zu GC reichen Sequenzen gezeigt werden. Thiocoralin besitzt eine antibiotische Wirkung gegen Gram-positive Bakterien. Aufgrund der Antitumorstoffwirkung gegenüber verschiedenen menschlichen Krebszelllinien ist Thiocoralin derzeit bei der Firma PharmaMar in präklinischen Untersuchungen der Phase II [PharmaMar, 2008]. Die Wirkung des Thiocoralins beruht hierbei auf den DNA-interkalierenden Eigenschaften und der damit verbundenen Inhibierung der DNA-Polymerase α .

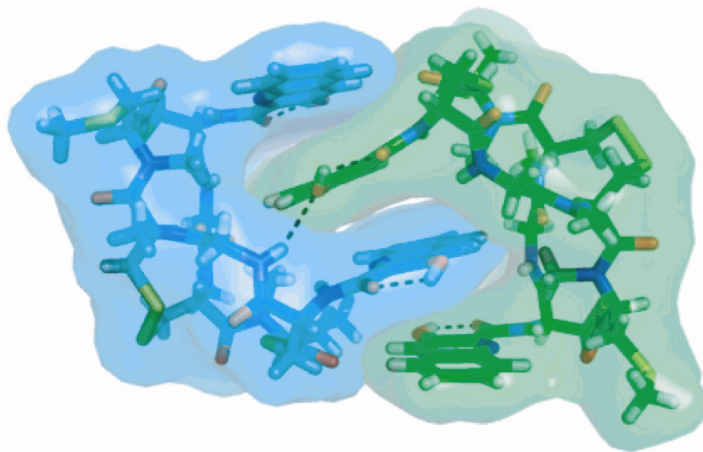


Abbildung 1.13: Röntgenkristallstruktur zweier Thiocoralinmoleküle in der asymmetrischen Einheit einer Einheitszelle. Die Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Amidproton des Glycins und der Hydroxylgruppe des Chromophors ist durch die gestrichelte Linie gekennzeichnet [Negri *et al.*, 2007].

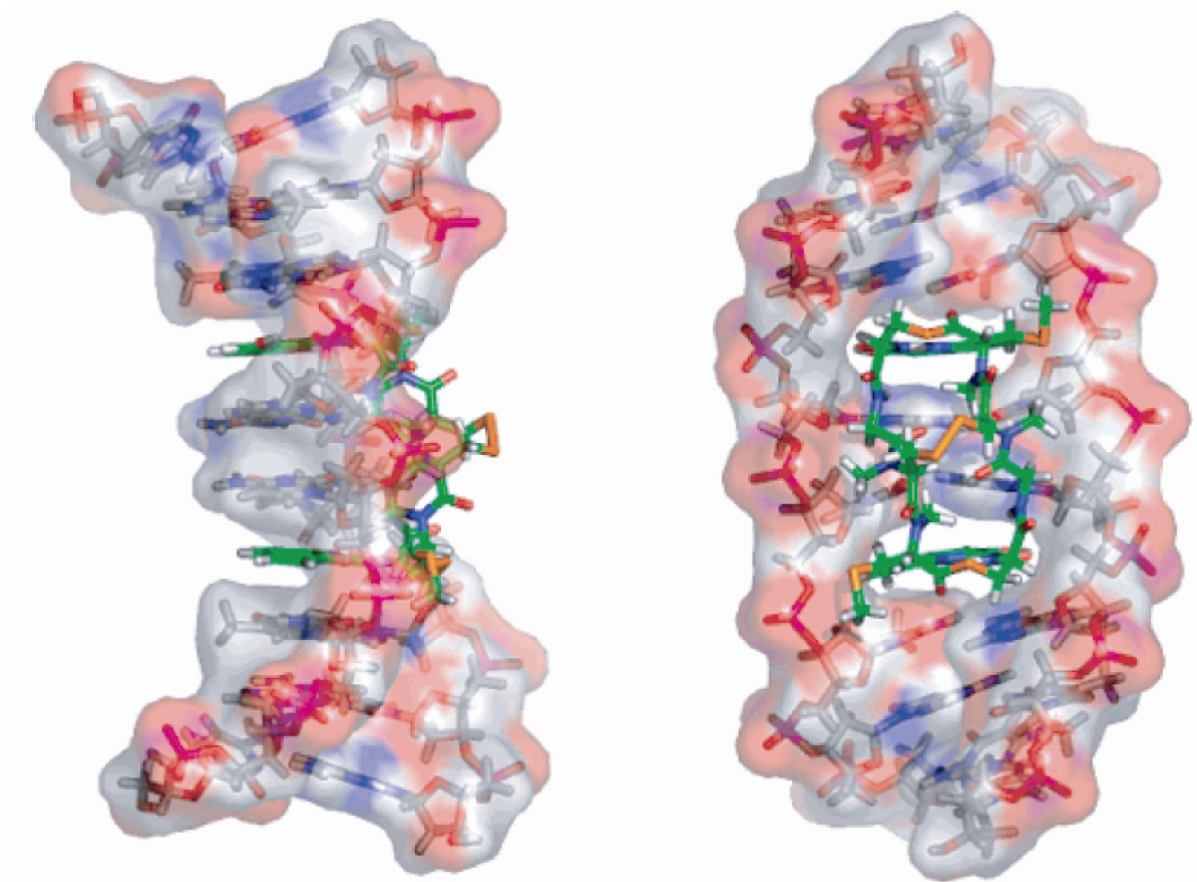


Abbildung 1.14: Seiten- und Frontansicht des Modells der Thiocoralin-Oligonukleotid-Interaktion (CATCGTG)₂ [Negri *et al.*, 2007].

1.8.2 Biosynthese von Thiocoralin

Thiocoralin wurde das erste Mal aus dem Stamm *Micromonospora* L-13-ACM2-092, der an Weichkorallen im indischen Ozean gefunden wurde, isoliert [Baz *et al.*, 2001]. Als weiterer Thiocoralinproduzent konnte *Micromonospora* ML1 identifiziert werden [Lombo *et al.*, 2006]. Die chromosomale DNA dieses Stammes diente auch zur Sequenzierung des Thiocoralin-Biosyntheseclusters, wodurch gezeigt werden konnte, dass Thiocoralin über nicht-ribosomale Peptidsynthese an zwei Synthetasen, TioR und TioS, assembliert wird (Abb. 1.7) [Lombo *et al.*, 2006]. Der iterative Charakter der NRPS wird auch hier, wie im Gramacidin S System, durch eine iterativ arbeitende Thioesterase vermittelt [Robbel *et al.*, 2008]. Neben den Genen für die Synthetasen TioR und TioS befinden sich weitere 24 Gene im Thiocoralin-Cluster (siehe Anhang 6.3). Diesen Genen wird eine Beteiligung an der Regulation, der Biosynthese einzelner NRPS-Bausteine und der Resistenz zugesprochen. Interessanterweise findet man im Thiocoralin-System zwei weitere NRPS, deren Produkt wahrscheinlich auch an der Regulation der Biosynthese von

Thiocoralin beteiligt ist. Die Analyse von Mutanten zeigte, dass die beiden zusätzlichen Synthetasen für die Thiocoralin-Produktion essentiell sind [Lombo *et al.*, 2006]. Die Anwesenheit von weiteren NRPS, die ein Peptid synthetisieren, das für die Biosynthese des Haupt-NRPS-Produktes wichtig ist, wurde auch in anderen Systemen beschrieben [Healy *et al.*, 2000].

Die Synthese von Thiocoralin beginnt mit der Aktivierung und Übertragung der 3-Hydroxychinaldinsäure auf die Synthetase TioR. Verantwortlich hierfür ist wahrscheinlich eine freistehende AMP-Ligase TioJ, die 3-HQA auf eine freistehende PCP-Domäne, TioO, überträgt. Anschließend erfolgt eine C-Domänen-katalysierte Übertragung auf TioR. In dem verwandten Triostin A NRPS-System konnte eine ähnliche Initiierungsabfolge gezeigt werden. Hier ist allerdings kein freistehendes PCP im Cluster kodiert. Es konnte aber gezeigt werden, dass ein ACP (AcpPSE) des Fettsäuremetabolismus diese Aufgabe übernimmt [Schmoock *et al.*, 2005]. Nach der Übertragung der 3HQA auf das erste Modul erfolgt der Einbau der weiteren vier Aminosäuren in die wachsende Peptidkette. Hierbei kommt es durch *in cis* stehende Domänen zur Epimerisierung von Cystein und zweimal zur N-Methylierung von Cystein. Eine weitere Modifizierung ist die S-Methylierung eines Cystein-Restes. Eine derartige Reaktion wurde bisher nicht beschrieben. Es wird vermutet, dass TioX, ein zur Familie der Glyoxylasen gehörendes Protein, die S-Methylierung katalysiert [Lombo *et al.*, 2006]. Anschließend kommt es zu Ligation und Zyklisierung durch eine endständige TE-Domäne, was auch zur Freisetzung des Thiocoralins von der Synthetase führt [Robbel *et al.*, 2008].

1.8.3 3-Hydroxychinaldinsäure-Biosynthese

Über die Chromophorbiosynthese der Chromodepsipeptide ist bis heute nur wenig bekannt. Lediglich für das Echinomycin-Chromophor Chinoxalinsäure und das Thiocoralin-Chromophor 3-Hydroxychinaldinsäure (3HQA) wurde bisher ein Biosyntheseweg ausgehend von den sequenzierten Biosyntheseclustern postuliert [Lombo *et al.*, 2006; Watanabe *et al.*, 2006]. Im Laufe dieser Arbeit sollte die Biosynthese des für die Aktivität des Thiocoralins entscheidenden Chromophors 3HQA untersucht werden.

Aufgrund von Sequenzvergleichen der Gene des Thiocoralin-Clusters mit Datenbankeinträgen wurde der in Abbildung 1.15 dargestellte Biosyntheseweg von Lombo *et al.* postuliert [Lombo *et al.*, 2006]. Die ersten drei Schritte erfolgen hierbei ähnlich dem Kynureninabbauweg des Tryptophans. Den ersten Schritt der Biosynthese soll das Enzym TioF katalysieren. Dieses

Enzym besitzt Homologien zu Tryptophan-2,3-Dioxygenasen (TDO). Diese Enzyme katalysieren im Katabolismus von Tryptophan die Umsetzung des Tryptophans zu N'-Formylkynurenin. TioF ist das einzige bisher charakterisierte Enzym des Thiocoralin-Clusters. Es katalysiert die postulierte Umsetzung des Tryptophans *in vitro* [Sheoran *et al.*, 2008]. Weiterhin weist TioF eine ungewöhnliche Substrattoleranz auf und katalysiert neben L-Tryptophan auch die Umsetzung von D-Tryptophan, Indol und Serotonin. TDO's wurden weiterhin im Daptomycin und Triostin A Biosynthesecluster gefunden und aus dem Actinomycin-Produzentenstamm *S. parvulus* gereinigt und charakterisiert [Hitchcock & Katz, 1988; Miao *et al.*, 2005; Watanabe *et al.*, 2006]. Der nächste Schritt der Biosynthese, die Deformylierung des N'-Formylkynurenins, könnte durch TioL, ein Enzym unbekannter Funktion, katalysiert werden. Diese Reaktion wird im Primärmetabolismus durch Formamidasen katalysiert. Im Thiocoralin-Cluster gibt es allerdings kein Enzym mit einer entsprechenden Homologie. Als weiteres Enzym, das an der Biosynthese beteiligt ist, wurde TioG vermutet. TioG besitzt hohe Homologien zu Aspartat/ Kynurenin-Aminotransferasen. In der 3HQA-Biosynthese soll TioG die Deaminierung des Kynurenins zur Kynureninsäure katalysieren. Um von der resultierenden Kynureninsäure zur 3-Hydroxychinaldinsäure zu gelangen, müsste die Hydroxyfunktion von der Position vier auf die Position drei übertragen werden. Es wurde daher postuliert, dass TioH als Oxidoreduktase die Hydroxygruppe der Kynureninsäure reduziert. In einem anschließenden Schritt wird die Chinaldinsäure zur 3-Hydroxychinaldinsäure oxidiert. Dieser Schritt könnte durch das Cytochrom P450 Enzym TioI katalysiert werden.

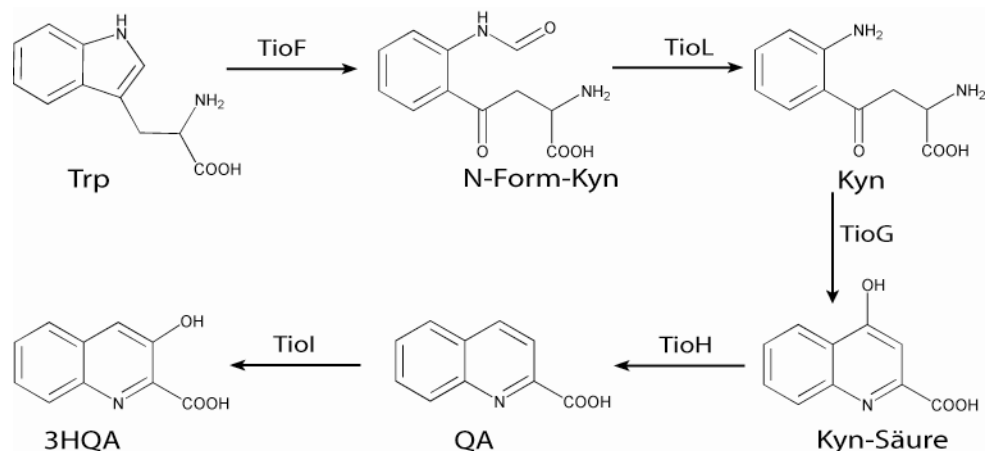


Abbildung 1.15: Postulierter Weg der Biosynthese der 3-Hydroxychinaldinsäure [Lombo *et al.*, 2006]. Trp = Tryptophan; N-Form-Kyn = N'-Formylkynurenin; Kyn = Kynurenin; Kyn-Säure = Kynureninsäure; QA = Chinaldinsäure, 3HQA = 3-Hydroxychinaldinsäure

1.9 Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit war es, die biosynthetischen Aspekte der Diversität der iterativen NRPS Produkte besser zu verstehen. Im ersten Teil der Arbeit sollte die Thioesterase der iterativen Gramacidin S Synthetase charakterisiert werden. Hierzu sollte diese in *E. coli* heterolog exprimiert und mittels des für lineare TE-Domänen entwickelten chemoenzymatischen Ansatzes *in vitro* untersucht werden. Dieses entspricht der ersten ausführlichen *in vitro*-Charakterisierung einer iterativen Thioesterase. Hierbei war die Identifizierung des biokombinatorischen Potentials und die mechanistische Betrachtung der iterativen Thioesterase in den Vordergrund gestellt worden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte ein Schlüsselschritt der 3-Hydroxychinaldinsäure-Biosynthese identifiziert werden. Hierzu wurden die Enzyme TioI, TioF und TioG heterolog in *E. coli* exprimiert und in *in vitro*-Assays auf ihre postulierte Funktion hin untersucht.

2. Material

2.1 Geräte

Gerät	Hersteller und Typenbezeichnung
Analysenwaagen	<i>Sartorius</i>
Autoklav	<i>Tuttnauer 5075 ELV</i> <i>IBS FVA A1</i>
Brutschrank	<i>Köttermann 2736</i>
Clean-Bench	<i>Antair BSK</i>
DNA-Agarosegel-Dokumentation	<i>Cybertech CS 1 Videokamera</i> <i>Mitsubishi Video Copy Processor</i> Thermodrucker
Elektroporator	<i>Biorad Gene Pulser II</i>
ESI-MS-System	<i>Hewlett Packard Series 1100</i>
FPLC-Säulen	<i>GE Healthcare</i> HighTrap Desalting <i>GE Healthcare</i> HiLoad Superdex Gelfiltrationssäule <i>GE Healthcare</i> GSTrap TM HP <i>GE Healthcare</i> HiTrap TM QFF
FPLC-System	<i>Amersham</i> FPLC-System 250: Gradienten-Programmer GP-250, Pumpen P-500 <i>Uvicord</i> Optische Einheit UV-1, <i>Uvicord</i> Kontroll Einheit UV-1 2-Kanal-Flachbrettschreiber REC-102 Injektions-Ventil V-7, 3-Wege-Magnetventil PSV-100 Fraktionssammler FRAC-100
Fluidizer	<i>Avestin</i> EmulsiFlex-C5
Gefriertrockner	<i>Christ</i> ALPHA 2-4 LSC
HPLC-System	<i>Agilent</i> series 1100 Vakuum-Entgaser, DAD-Detektor, Quaternäre Pumpe, Auto-sampler, HP-ChemStation Rev. A.06.03 [509]
Luftschüttler	<i>New Brunswick Scientific</i> Series 25, Innova 4230, Innova 4300, <i>Invors</i> Multitron, Unitron

Gerät	Hersteller und Typenbezeichnung
Netzgeräte	GIBCO BRL ST304/ ST504
MALDI-TOF	<i>Bruker</i> FLEXIII
Peptid-Synthetisierer	<i>Advanced ChemTech</i> APEX396 Synthesizer
PCR-Maschine	<i>Eppendorf</i> Mastercycler Personal <i>Perkin Elmer</i> GeneAmp PCR-System 9700, GeneAmp PCR-System 2400
pH-Meter	<i>Schott</i> CG 840
Scintillisationszähler	<i>Packard</i> TRI-CARB 2100 TR
Software	<i>Adobe</i> Photoshop 7.0 <i>Chem</i> Draw Pro Version 4.0.1 <i>GATC</i> Lasergene DNASTar 5.0 <i>Microsoft</i> Office XP Sigma Plot 8.0 Sci Ed Central Clone Manager 6
Spektrophotometer	<i>Peqlab</i> NanoDrop ND-1000 Ultrospec® 3100 <i>Beckman Coulter</i> DU® 800
SpeedVak	<i>Uniequip</i> Univapo 150
Thermoblock	<i>Techne</i> Dri-Block® DB-2A
Thermoschüttler	<i>Eppendorf</i> Thermomixer Compact
Ultraschallsonde	<i>Bandelin</i> elektronik UW 200
Vakuumgeltrockner	<i>Fisherbrand</i> FSGD-5040
Vortexer	<i>Scientific Industries</i> Vortex Genie 2 <i>Heidolph</i> Reax Top
Wasserentionisierer	<i>Seral</i> Seralpur Pro 90 CN
Zentrifugen	<i>Haraeus</i> Biofuge Pico, Megafuge 1.0R, Minifuge RF <i>Sorvall</i> RC 26 Plus und RC 5B Plus mit Rotoren SS-34 und SLA-3000

2.2 Chemikalien und Enzyme

Alle nachfolgend nicht aufgelisteten Chemikalien wurden von den Firmen *Merck*, *Fluka* oder *Sigma-Aldrich* in *p.a.* Qualität bezogen:

Hersteller	Produkt(e)
<i>Bachem</i>	Fmoc, Boc, Trityl, t-Butyl geschützte Aminosäuren
<i>Biomol</i>	DTT
<i>Eurogentech</i>	Agarose, Elektroporationsküvetten
<i>Fermentas</i>	PageRuler Protein-Marker
<i>Fluka</i>	TEMED, SDS
<i>GE Healthcare</i>	Antibiotika, Coomassie Brilliant Blue G and R250, Hefeextrakt, IPTG, Agar Nr. 1, Proteinase K, Lysozym
<i>Invitrogen</i>	pBAD Directional TOPO® Expression Kit
<i>Macherey und Nagel</i>	Nucleodur und Nucleosil HPLC Säulen
<i>Millipore</i>	Sterilfilter (0,25 µm und 0,45 µm Porengröße),
<i>New England Biolabs</i>	T4 DNA Ligase, Restriktionsendonukleasen, DNA- und Proteinmarker, Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase, Desoxyribonukleotide
<i>Novabiochem</i>	Fmoc, Boc, Trityl, t-Butyl geschützte Aminosäuren, 2-Chlorotritylchlorid Harz, HBTU, HOBt, PyBOP
<i>Operon</i>	synthetische Oligonukleotide (Primer)
<i>Oxoid</i>	Bactotrypton, Agar Nr. 1
<i>Qiagen</i>	QIAquick-spin PCR Purification Kit, Plasmidpräparationskit, Ni ²⁺ -NTA-Agarose, QIAexpress Vector Kit, tip 20 Anionenaustauschersäulen
<i>Roth</i>	Ethidiumbromid, Glycin, Isopropanol, Acrylamid, Piperidin
<i>Sigma</i>	Bromphenolblau, Arabinose, N-Acetylcysteamin, Koenzym A, Thiophenol

Hersteller	Produkt(e)
<i>Stratagene</i>	PfuTurbo DNA Polymerase
<i>Vivascience AG</i>	Vivaspin 20 Konzentratoren

2.3 Vektoren

2.3.1 pQE60-Vektor

Dieser zur rekombinanten Genexpression verwendete Vektor basiert auf dem Plasmid pDS56/RBSII [Stüber *et al.*, 1990]. Der pQE-Vektor besitzt einen T5-Promoter, zwei lac-Operatorerkennungssequenzen und eine synthetische ribosomale Bindungsstelle, die auf hohe Expressionsraten in *E. coli* optimiert ist. Das Plasmid verleiht Resistenz gegen Ampicillin durch Expression des β -Lactamase-Gens *bla* und repliziert in *E. coli* mittels des Replikationsursprungs ColE1 aus pBR322 [Scutcliffe, 1979].

2.3.2 pET-Vektoren

In dieser Arbeit wurden verschiedene Derivate des pET-Vektors für die rekombinante Genexpression verwendet. Allen verwendeten pET-Vektoren ist der T7-Promotor sowie der pBR322 Replikationsursprung gemein. Des Weiteren tragen die verwendeten Plasmide ein Kanamycin-Resistenz-vermittelndes Gen, einen *lac*-Operator und eine *lacI*-kodierende Sequenz.

pET28a

Der pET28a-Vektor wurde für die Expression von rekombinanten Proteinen mit N-terminaler oder C-terminaler His-Tag Fusion verwendet.

pCL11

Dieser verwendete Vektor ist ein pET16b-Derivat mit einer Insertion des *Bam*HI/ *Hind*III Fragments aus dem pQE60-Vektor, welches für den Hexa-Histidine-Tag kodiert. Somit kann das rekombinante Protein mit einer C-terminalen His-Tag Fusion koexprimiert werden,

pETNusa

Zusätzlich zu dem His-Tag kodiert dieser pET-Vektor für das löslichkeitssteigernde Fusionsprotein NusA. Dieses kann nach der Expression mittels der Tev-Protease wieder abgespalten werden.

pET41

Der pET41-Vektor ermöglicht eine N-terminale His-Tag, GST-Tag oder S-Tag Fusion, sowie eine C-terminale His-Tag Fusion mit den rekombinanten Proteinen.

2.3.3 pBADM30-Vektor

Dieser Expressionsvektor kodiert neben einem N-terminalen His-Tag für das löslichkeitssteigernde Fusionsprotein Glutathion-S-Transferase. Rekombinante Proteine können somit über den His-Tag als auch über die Glutathion-S-Transferase gereinigt werden. Die Expression steht unter Kontrolle des *araBAD*-Promoters [Guzman *et al.*, 1995]. Weiterhin trägt der Vektor den Replikationsursprung pUC und das Ampicillin-Resistenz vermittelnde *bla*-Gen.

2.3.4 pBAD₂₀₂ D/TOPO-Vektor

Dieser zur pUC-Familie gehörende pBAD-Vektor ermöglicht eine Topoisomerase-vermittelte, effiziente Klonierung. Die Expression steht unter Kontrolle des *araBAD* Promotor-Systems. Die Löslichkeit rekombinanter Proteine soll durch eine im Leserahmen liegende Thioredoxin Fusion gesteigert werden.

2.3.5 pGEX-Vektor

Der pGEX-Vektor ermöglicht eine löslichkeitssteigernde Glutathion-S-Transferasen Fusion. Der Vektor trägt den pBR322-Replikationsursprung sowie den Tac-Promotor und den Repressor LacI. Das β -Lactamase-Gen *bla* vermittelt Ampicillin-Resistenz. Die Reinigung der rekombinanten Proteine erfolgt über die Bindung der Glutathion-S-Transferase an immobilisiertes Glutathion. Anschließend kann das rekombinante Protein durch Abspaltung des Glutathion-S-Transferase-Tags mit Thrombin von der Säule freigesetzt werden oder durch Glutathion-haltigen Puffer von der Säule eluiert werden.

2.3.6 pREP4-Vektor

Das Helferplasmid pREP4 ist mit seinem Replikationsursprung P15A [Miller, 1992] kompatibel zu ColE1-Plasmiden und kann so in Kombination mit pQE60-Vektoren in *E. coli* repliziert werden. Es exprimiert den durch das *lacI*-Gen kodierten Lac-Repressor, welcher die gezielte Expression im pQE-System ermöglicht. Das Plasmid trägt das *neo*-Gen, das eine Kanamycin-Resistenz vermittelt. Durch eine mutierte ribosomale Bindungsstelle wird das *neo*-Gen nur gering exprimiert. Hieraus resultiert eine erhöhte Sensibilität gegenüber Kanamycin, so dass 25 µg/mL Kanamycin zur Selektion der plasmidtragenden Zellen verwendet wurden.

2.4 Mikroorganismen

2.4.1 *Escherichia coli* TOP10

Der Stamm *Escherichia coli* TOP10 wurde für Klonierungsarbeiten verwendet. Er besitzt den Genotyp F- *mcrA*. (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) 80*lacZ*.M15.*lacX74 deoR recA1 araD139. (ara-leu)* 7697 *galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG*.

2.4.2 *Escherichia coli* BL21 (DE3)

Dieser *E. coli*-Stamm mit dem Genotyp *E. coli* B, F⁻, *dcm*, *ompT*, *hsdS* (r_B-m_B-), *gal* wurde als bakterieller Wirt für die Expression von Plasmid-DNA verwendet. Er zeichnet sich durch den Mangel an Ion (Protease) und das Fehlen von OmpT (Protease der Außenmembran) aus.

2.4.3 *Escherichia coli* M15/ pREP4

Dieser Stamm wurde zur Expression von rekombinanten Proteinen aus dem pQE60-Vektor verwendet. Die Gegenwart des pREP4-Vektors ermöglicht durch Produktion des Lac-Repressors die gezielte mit IPTG induzierte Expression. Der Genotyp sieht wie folgt aus: *nals*, *strs*, *rifs*, *lac*, *ara*, *gal*, *mtl*, F- [Zamenhof & Villarejo, 1972].

2.4.4 *Micromonospora L-13-ACM2-092*

Das Gram-positive Bakterium *Micromonospora L-13-ACM2-092* gehört zur Familie der Micromonosporaceae und somit zur Klasse der Aktinobakteria. In einem Patent aus dem Jahr 2001 wurde dieser Stamm, der aus einer Koralle von der Küste von Mozambique isoliert wurde, das erste Mal beschrieben [Baz *et al.*, 2001]. Sein wissenschaftliches Interesse begründet sich in

der Produktion des Sekundärmetaboliten Thiocoralin. Erhalten wurde der hier verwendete Stamm von der spanischen Stammsammlung Coleccion Espanola de Cultivos Tipo (CECT-3326).

2.4.5 *Bacillus brevis* ATCC 9999

Die chromosomale DNA dieses Gram-positiven Bakteriums wurde verwendet, um die Gene der Gramicidin S NRPS zu amplifizieren.

2.5 Medien

2.5.1 LB-Medium

Für die Anzucht von *E. coli* diente LB-Medium.

LB-Medium

10 g/L Bactotrypton

5 g/L Hefeextrakt

5 g/L NaCl

2 g/L MgCl₂ (Zusatz bei Expressionen von
Adenylierungsdomänen)

Dem Medium wurde nach Bedarf Antibiotika in den Standardkonzentrationen 100 µg/mL Ampicillin und 25 oder 50 µg/mL Kanamycin zugesetzt.

2.5.2 MS-Medium

Zur Anzucht von *Micromonospora L-13-ACM2-092* wurde das im Patent beschriebene Anzuchtmedium verwendet [Baz *et al.*, 2001].

MS-Medium

5	g/L Glukose
20	g/L Stärke
3	g/L Rinderextrakt
5	g/L Hefeextrakt
5	g/L Trypton
4	g/L CaCO_3
4	g/L NaCl
1	g/L Na_2SO_4
0,5	g/L KCl
2	g/L MgCl_2
0,5	g/L K_2HPO_4

3. Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Konstruktion der Plasmide

Die zur Konstruktion der Plasmide verwendeten Techniken sind größtenteils etabliert und in Standardwerken beschrieben [Sambrook *et al.*, 1989]. Im Folgenden soll ein kurzer Überblick gegeben und auf die Besonderheiten der einzelnen Klonierungen genauer eingegangen werden.

Mittels der Polymerase-Kettenreaktion und synthetischer Oligonukleotide (Operon) wurden die verwendeten DNA-Fragmente amplifiziert. Als Anleitung dienten die vom Hersteller der Polymerasen angegebenen Protokolle. Die Reinigung erfolgte mit dem „QIAquick-spin PCR purification kit“ nach den Vorschriften des Herstellers (Qiagen). Im gegebenen Falle wurden die Fragmente mit Restriktionsendonukleasen nach Herstellerangaben (New England Biolabs) 3-4 h bei 37°C geschnitten. Die anschließende Ligation wurde mit der T4 DNA Ligase (New England Biolabs) bei 16°C über Nacht durchgeführt. Die Produktion der Plasmide erfolgte nach der chemischen oder elektrischen Transformation in *E. coli* TOP10-Zellen. Die nach dem Prinzip der alkalischen Lyse erhaltene Plasmide, wurden mittels Restriktionsverdau und Sequenzierung durch die Firma GATC Biotech verifiziert [Birnboim & Doly, 1979].

3.1.1.1 Die Gramicidin S NRP-Synthetase-Konstrukte

Konstruktion von pBAD202/D-TOPO GrsB PCP-TE

Dieses Konstrukt wurde bereits beschrieben [Mahlert, 2007].

Konstruktion von pQE60 GrsB TE_{Lang}

Mit den synthetischen Oligonukleotiden 5'-TTT CCA TGG TAA ACG AAG CAG ATA G-3' und 5'-ATT GGA TCC TAC AAA TGT CCC TTG TAG-3' wurde das GrsB TE_{Lang}-Genfragment aus der chromosomalen DNA von *Bacillus brevis* ATCC 9999 mittels der Pfu Turbo DNA Polymerase (Stratagene) erhalten. Nach Reinigung und Restriktionsverdau mit den Restriktionsendonukleasen *NcoI* und *BamHI* wurde das Genfragment in den pQE60-Vektor ligiert.

Konstruktion von pCL11 GrsB TE_{Kurz}

Mit den synthetischen Oligonukleotiden 5'- TTT CCA TGG TAA ACG AAG AAA CAG ATC G -3' und 5'- ATT GGA TCC TAC AAA TGT CCC TTG TAG -3' wurde das GrsB TE_{Kurz}-Genfragment aus der chromosomalen DNA von *Bacillus brevis* ATCC 9999 mittels der Pfu Turbo DNA Polymerase (Stratagene) erhalten. Nach Reinigung und Restriktionsverdau mit den Restriktionsendonukleasen *NcoI* und *BamHI* wurde das Genfragment in den pCL11-Vektor ligiert.

3.1.1.2 Die Thiocoralin-Cluster-Konstrukte

Konstruktion von pET28 TioI

Mit den synthetischen Oligonukleotiden 5'- AAC ATA TGA GTT CGC CCA CGG CCA GCA C -3' und 5'- TTG GAT CCT CAG CGA CCC GTG AAG GCG A -3' wurde das TioI-Genfragment aus der chromosomalen DNA von *Micromonospora* L-13-ACM2-092 mittels der PhusionTM High Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes) erhalten. Nach Reinigung und Restriktionsverdau mit den Restriktionsendonukleasen *NdeI* und *BamHI* wurde das Genfragment in den pET28(a+)-Vektor ligiert.

Konstruktion von pET28 TioF/ TioG

Mit den synthetischen Oligonukleotiden 5'- AAC ATA TGC CCC TGC CAA GCC CCT ATC C -3' und 5'- TTC TCG AGC TGC GTG TGG GCA GTC -3' wurde das TioG/ TioF-Genfragment aus der chromosomalen DNA von *Micromonospora* L-13-ACM2-092 mittels der PhusionTM High Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes) erhalten. Nach Reinigung und Restriktionsverdau mit den Restriktionsendonukleasen *NdeI* und *XhoI* wurde das Genfragment in den pET28(a+)-Vektor ligiert.

Konstruktion von pET28 TioK

Mit den synthetischen Oligonukleotiden 5'-TTA AGC TTA TCA GGG GCG CCC GAA GGG GAT-3' und 5'-AAC ATA TGC CCA CCG TTG CGG AAT TGT TTG-3' wurde das TioK-Genfragment aus der chromosomalen DNA von *Micromonospora* L-13-ACM2-092 mittels der PhusionTM High Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes) erhalten. Nach Reinigung und Restriktionsverdau mit den Restriktionsendonukleasen *NdeI* und *HindIII* wurde das Genfragment in den pET28(a+)-Vektor ligiert.

Konstruktion von pGEX TioK

Mit den synthetischen Oligonukleotiden 5'-AAG AAT TCG TGC CCA CCG TTG CGG AAT TG-3' und 5'-AAG CGG CCG CGG GCG CCC GTT GGG GAT G-3' wurde das TioK-Genfragment aus der chromosomalen DNA von *Micromonospora* L-13-ACM2-092 mittels der Phusion™ High Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes) erhalten. Nach Reinigung und Restriktionsverdau mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *NotI* wurde das Genfragment in den pGEX-Vektor ligiert.

Konstruktion von pNusa TioK

Mit den synthetischen Oligonukleotiden 5'-AAA ACC ATG GTG CCC ACC GTT GCG G-3' und 5'-AAA AAA GCT TAA TCA GGG GCG CCC GTT GG-3' wurde das TioK-Genfragment aus der chromosomalen DNA von *Micromonospora* L-13-ACM2-092 mittels der Phusion™ High Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes) erhalten. Nach Reinigung und Restriktionsverdau mit den Restriktionsendonukleasen *NcoI* und *HindIII* wurde das Genfragment in den pNusa-Vektor ligiert.

Konstruktion von pET41 TioK A

Mit den synthetischen Oligonukleotiden 5'-AAC ATA TGC CCA CCG TTG CGG AAT TGT TTG-3' und 5'-AAA AAA GCT TGG CGA GGT CCC GCA ACG-3' wurde das Genfragment der Adenylierungsdomäne aus TioK aus der chromosomalen DNA von *Micromonospora* L-13-ACM2-092 mittels der Phusion™ High Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes) erhalten. Nach Reinigung und Restriktionsverdau mit den Restriktionsendonukleasen *NdeI* und *HindIII* wurde das Genfragment in den pET28(a+)-Vektor ligiert.

Konstruktion von pET28 TioK PCP

Mit den synthetischen Oligonukleotiden 5'- TTA AGC TTA TCA GGG GCG CCC GAA GGG GAT -3' und 5'- AAC ATA TGC CTC CCG GCG AGG ATC C -3' wurde das Genfragment der PCP-Domäne aus TioK aus der chromosomalen DNA von *Micromonospora* L-13-ACM2-092 mittels der Phusion™ High Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes) erhalten. Nach Reinigung und Restriktionsverdau mit den Restriktionsendonukleasen *NdeI* und *HindIII* wurde das Genfragment in den pET28(a+)-Vektor ligiert.

3.1.2 Präparation von chromosomaler DNA

Zur Präparation von chromosomaler DNA aus *Bacillus brevis* und *Micromonospora* L-13-ACM2-092 wurden die Zellen einer 2 mL-Übernachtskultur durch Zentrifugation (13000 Upm, 4°C) pelletiert und anschließend in 1 mL B1-Puffer resuspendiert. Diese Lösung wurde mit 20 µL Lysozym-Lösung (100 mg/ml) und 45 µL Proteinase K-Lösung (20 mg/mL) eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach anschließender Zugabe von 350 µL B2-Puffer wurde weitere 15 min bei 37°C inkubiert. Nach Versetzung des Lysates mit 1,5 mL QBT-Puffer wurde auf eine vorher äquilibrierte QIAgen tip20-Anionentauschersäule aufgetragen. Nach mehrmaligem Waschen mit QC-Puffer wurde mit 2 mL QF eluiert. Nach anschließender Fällung mit 0,7 mL Isopropanol (13000 Upm, 30 min, RT) wurde die chromosomale DNA mit 70%igen Ethanol gewaschen und in 200 µL EB-Puffer aufgenommen. Die DNA wurde bei -80°C gelagert.

B1-Puffer

Tris/HCl, pH 8,0	50 mM
Tween-20	0,5% (w/v)
Triton X-100	0,5% (w/v)
EDTA	50 mM

B2-Puffer

GuHCl	3 M
Tween-20	20% (w/v)

QBT-Puffer

MOPS, pH 7,0	50 mM
NaCl	750 mM
Triton X-100	0,15% (w/v)
Ethanol	15% (w/v)

QC-Puffer

MOPS, pH 7,0	50 mM
NaCl	1 M
Ethanol	15% (w/v)

QF-Puffer

MOPS, pH 7,0	50 mM
NaCl	1,25 M

EB-Puffer

Tris, pH 8,5	10 mM
--------------	-------

3.1.3 Sequenzierung der DNA-Konstrukte

Die Sequenzierung wurde von der Firma GATCBiotech ausgeführt. Da im Falle der Gene des Thiocoralin-Clusters aus *Micromonospora* L-13-ACM2-092 keine Sequenzen bekannt waren, wurden mindestens zwei Amplifikate sequenziert und verglichen.

3.2 Proteinchemische Methoden

3.2.1 Genexpression

Für die Expression der Zielproteine wurden die jeweiligen Plasmide in den Stamm BL21(DE3) oder im Falle des pQE60-Vektors in M15/ pREP4 retransformiert.

Zur präparativen Expression wurden 1 bis 5 L LB-Medium 1:100 (v/v) mit der Übernachtskultur des geeigneten Produzentenstammes inokuliert. Es wurde bei verschiedenen Temperaturen und 200-250 Upm im Luftschüttler inkubiert bis die Kultur eine OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,7 erreichte. Die Induktion der Expression erfolgte durch Zugabe einer Arabinose- oder IPTG-Lösung (Tab. 3.1). Die Kultur wurde dann zusätzliche 1-24 h bei der Induktionstemperatur im Luftschüttler inkubiert. Nach der Ernte der Zellen (5000 Upm, 4°C) wurde das Zellpellet im geeigneten Puffer für die Reinigung resuspendiert. Die Zellsuspension konnte direkt aufgeschlossen oder alternativ bis zur nächsten Verwendung bei -20°C gelagert werden.

Protein (Vektor)	Induktions- temperatur	Induktions- zeit	Induktor	Mediumszusätze
GrsB PCP-TE (pBAD202D/TOPO)	25-30°C	2,5 h	Arabinose (0,01%)	
GrsB TE _{Lang} (pQE60)	25-30°C	2,5 h	IPTG (0,1 mM)	
GrsB TE _{Kurz} (pCL11)	25-30°C	2,5 h	IPTG (0,1 mM)	
Sfp (pQE60)	37°C	3 h	IPTG (0,2 mM)	
TioI (pET28)	18°C	14-18 h	IPTG (0,1 mM)	30 mg/L δ -Aminolevulin- säure 20 mg/L FeCl ₃
TioG/ TioF (pET28)	18°C	14-18 h	IPTG (0,1 mM)	20 mg/L δ -Aminolevulin- säure 10 mg/L FeCl ₃
TioK (pET28)	18°C	14-18 h	IPTG (0,1 mM)	
A TioK (pET41)	18°C	14-18 h	IPTG (0,1 mM)	
TioK (pET41)	18°C	14-18 h	IPTG (0,1 mM)	
TioK (pGEX)	18°C	14-18 h	IPTG (0,1 mM)	
TioK (pBADM30)	18°C	14-18 h	Arabinose (0,02%)	
TioK (pETNusa)	18°C	14-18 h	IPTG (0,1 mM)	
PCP TioK (pET28)	18°C	14-18 h	IPTG (0,2 mM)	

Tabelle 3.1: Expressionsbedingungen der in der Arbeit verwendeten Konstrukte.

3.2.2 Proteinreinigung

3.2.2.1 Zellaufschluss

Die resuspendierten Zellen wurden mit Hilfe eines Fluidizers aufgeschlossen. Bei kleineren Maßstäben, die zur Optimierung der Expressionsbedingungen dienten, erfolgte der Aufschluss mittels Ultraschall. Nach dem Aufschluss wurden die erhaltenen Suspensionen durch Zentrifugation (17000 Upm/ 4°C/ 30 min) von unlöslichen Bestandteilen befreit und der Überstand für die nachfolgenden Reinigungsschritte verwendet.

Zellaufschluss mittels Ultraschall

Bei dieser Art des Zellaufschlusses wird die Zellsuspension der Ultraschallschwingung ausgesetzt.

Die Zellsuspension wurde 5x für 30 sec bei einer gerätespezifischen Maximaleinstellung von 25-30% Leistung des Spannungsgerätes und einem Arbeitsintervall von 80% beschallt. Zwischen den Beschallungen wurde jeweils 30 sec auf Eis pausiert.

Zellaufschluss mittels Fluidizer

Bei dieser Art des Zellaufschlusses wird die Zellsuspension hohen Drücken ausgesetzt. Die Zellen wurden dreimal bei 60.000-100.000 kPa durch eine mit Eis vorgekühlte Emulsi-Flex Zelle geschleust.

3.2.2.2 Ni-NTA-Chromatographie

Alle rekombinanten His-Tag tragenden Proteine wurde über Ni-NTA-Affinätschromatographie an einer FPLC-Anlage (Amersham Biosciences) gereinigt. Hierzu wurde der Zellextrakt auf eine mit Ni^{2+} -NTA Superflow (Qiagen) befüllte Säule (HR 10/2, Amersham Biosciences) geladen (0,75 mL/min, 98% Hepes A, 2% Hepes B). Anschließend wurde die Säule solange gespült bis keine Proteine mehr im Durchfluss detektiert wurden. Hierzu wurde die Absorption mittels einer Durchflusszelle bei 280 nm verfolgt. Anschließend wurden die Zielproteine mit einem steigenden Hepes B Gehalt (Imidazolgehalt) von der Säule eluiert (1 mL/min). Proteinhaltige Fraktionen wurden mittels Bradford-Test [Bradford, 1976] identifiziert und SDS-PAGE analysiert.

Hepes A

Hepes	50 mM
NaCl	300 mM

Hepes B

Hepes	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	250 mM

Dialysepuffer

Hepes	50 mM
NaCl	100-150 mM

3.2.2.3 Glutathion-S-Transferase (GST)-Affinitätschromatographie

Das GST-Fusions-Protein ermöglicht die Reinigung und Trennung mittels einer Glutathion immobilisierten Matrix an der FPLC-Anlage (Amersham Biosciences). Die Glutathion-Sepharose wurde zunächst mit PBS-Puffer äquilibriert, bevor bei einer Flussrate von 0,25 mL/min das Zelllysate aufgetragen wurde. Nach Waschen der Säule mit PBS-Puffer konnte das Fusionsprotein mit dem Elutionspuffer eluiert werden. Proteinhaltige Fraktionen wurden mittels Bradford-Test identifiziert und SDS-PAGE analysiert.

PBS-Puffer

NaCl	140 mM	
KCl	2,7 mM	
Na ₂ HPO ₄	10 mM	
KH ₂ PO ₄	1,8 mM	pH 7,3

Elutionspuffer

Tris(HCl)	50 mM	
Glutathion reduziert	10 mM	pH 8

3.2.2.4 Gelfiltrationschromatographie

Die Gelfiltrationschromatographie wurde in dieser Arbeit als zweiter Reinigungsschritt verwendet, wenn die Proteinreinigung der Affinitätschromatographie nicht ausreichte. Die Fraktionierung verschiedener Proteine basiert hierbei auf ihrem unterschiedlichen, auf ihrer Größe beruhenden, Diffusionsverhalten in der Gel-Matrix.

Zunächst wurde die Säule, 16/60 Superdex[®] G75 prep grade (Amersham Biosciences) mit zwei Volumen Dialyse-Puffer äquilibriert und anschließend die Proteine aufgetragen (1 mL/min). Die Elution der Proteine erfolgte durch Dialyse-Puffer bei einer Flussrate von 1-2 mL/min. Proteinhaltige Fraktionen wurden mittels Bradford-Test identifiziert und SDS-PAGE analysiert.

Dialysepuffer

HEPES

50 mM

NaCl

100-150 mM

3.2.2.5 Abspaltung des GST-Tags

Der pGEX-Vektor ermöglicht die Abspaltung des Fusionsproteins durch eine eingebaute Thrombin-Schnittstelle. Hierzu wurde wie im Abschnitt 3.2.2.3 beschrieben vorgegangen und nach dem Auftragen des Fusionsproteins und dem Waschen der Säule 2 mL einer 100 Units enthaltenen Thrombin/ PBS-Lösung auf 2 mL Säulenmaterial gegeben. Nach zweistündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde das rekombinante Protein (ohne GST-Tag) zusammen mit der Protease von der Säule mittels PBS-Puffer eluiert. Proteinhaltige Fraktionen wurden mittels Bradford-Test identifiziert und SDS-PAGE analysiert.

3.2.2.6 Dialyse und Ankonzentration der rekombinanten Proteine

Im Anschluss an die Reinigung wurden die rekombinanten Proteine entweder über drei Dialyseschritte im Dialyseschlauch bei 4°C oder über HiTrap-Desalting-Säulen (GE Healthcare) nach Herstellerangaben umgepuffert. Anschließend wurden die rekombinanten Proteine über Viva-Spin-Säulen ankonzentriert. Hierbei wird die Salzlösung durch eine Membran mit der passenden Ausschlussgröße (5-50 MW) durch Zentrifugation bei 4000 Upm gedrückt. Die Proteine wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.2.2.7 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in Lösung erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 280 nm [Gill & von Hippel, 1989]. Der hierfür benötigte Extinktionskoeffizient wurde mit dem Computerprogramm Protean und der Aminosäuresequenz berechnet (Tab. 3.2).

Protein (Vektorsystem)	Fusionstag	Molarer	MW/ kDa
		Theoretischer Extinktionskoeffizient	
GrsB PCP-TE (pBAD202D/TOPO)	N-terminal Thioredoxin C-terminal His-Tag	59,98 10^{-3}	59,33
GrsB TE _{Lang} (pQE60)	C-terminal His-Tag	34,99 10^{-3}	33,31
GrsB TE _{Kurz} (pCL11)	C-terminal His-Tag	34,99 10^{-3}	30,37
TioI (pET28)	N-terminal His-Tag	55,67 10^{-3}	46,85
TioK (pGEX)	N-terminal GST-Tag	92,3 10^{-3}	90,28
TioK ohne GST (pGEX)	-	51,14 10^{-3}	65,15
TioK (pBadM30)	N-terminal GST-Tag N-terminal His-Tag	99,27 10^{-3}	92,05
TioK (Nusa)	N-terminal Nusa N-terminal His-Tag	83,22 10^{-3}	120,45
PCP TioK (pET28)	N-terminal His-Tag	5,81 10^{-3}	11,61
TioG (pET28)	N-terminal His-Tag	42,77 10^{-3}	47,89
TioF (pET28)	C-terminal His-Tag	31,96 10^{-3}	27,11
TioH (pET28)	N-terminal His-Tag	24,16 10^{-3}	28,67

Tabelle 3.2: Extinktionskoeffizienten und molare Masse der in der Arbeit verwendeten rekombinanten Proteine.

3.3 Biochemische und Analytische Methoden

3.3.1 GrsB TE/ PCP-TE vermittelte Ligation und Peptidzyklisierung

In einem typischen Reaktionsansatz wurden 300 μ M Substrat in einem Volumen von 50 μ L in Dialysepuffer (50 mM Hepes, 100 mM NaCl, pH 7,5) bei 25°C inkubiert. Die Substrat-Stocklösungen bestanden aus 15 mM Substrat gelöst in Dialysepuffer mit variierenden Mengen an DMSO (zur Löslichkeitssteigerung, <20% v/v). Die Reaktionen wurden durch Zugabe der Thioesterase in Endkonzentrationen von 10 μ M gestartet. Als Kontrolle diente jeweils die gleiche Reaktion ohne Thioesterase. Nach 90 min wurden die Reaktionen mit 10 μ L 4% TFA/H₂O

abgestoppt und mittels RP-LCMS (Agilent 1100 MSD) analysiert. Zur Trennung wurde eine Nucleodur 125/3 C₁₈ (ec) Säule (Macherey und Nagel; Poren Durchmesser, 100 Å; Partikel Größe, 3 µm) mit folgendem Gradienten verwendet: 0-40 min, 5-60% MeCN/0,1% TFA in H₂O/0,1% TFA, 40-45 min, 60-95% MeCN/0,1% TFA in H₂O/0,1% TFA, 0,5 mL/min, 40°C.

Zur Trennung der Reaktionsprodukte von GS5_{SPh}, GS5_{SNAC} und GS10 wurde eine Nucleodur 250/2 C₁₈ (ec) Säule (Macherey und Nagel; Poren Durchmesser, 100 Å; Partikel Größe, 3 µm) mit folgendem Gradienten verwendet: 0-40 min, 5-60% MeCN/ 0,1% TFA in H₂O/ 0,1% TFA, 40-45 min, 60-95% MeCN/ 0,1% TFA in H₂O/ 0,1% TFA, 0,3 mL/min, 45°C.

Für die Trennung der Reaktionsprodukte von GS4 und GS7 wurde folgender Gradient verwendet: 0-1 min, 5% MeCN/0,1% TFA in H₂O/0,1% TFA, 1-35 min, 5-60% MeCN/0,1% TFA in H₂O/0,1% TFA, 35-40 min, 60-95% MeCN/0,1% TFA in H₂O/0,1% TFA 0,2 mL/min bzw. 0,5 mL/min, 45°C bzw. 50°C.

Für die Trennung der Ligationsreaktionen der Substrate GS10_{Ala1-5} und GS7_{Ala6-7} wurde folgender Gradient verwendet: 0-3 min, 5% MeOH/0,1% TFA in H₂O/0,1% TFA, 3-12 min, 5-40% MeOH/0,1% TFA in H₂O/0,1% TFA, 12-42 min, 40-95% MeOH/0,1% TFA in H₂O/0,1% TFA 0,2 mL/min, 45°C.

Kinetische Charakterisierungen der Dimerisierungs- und Zyklisierungsreaktionen erfolgten durch Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeit bei verschiedenen Substratkonzentrationen. Hierbei wurden für jede Substratkonzentration zwei Zeitpunkte innerhalb der linearen Region der Reaktion analysiert. Für die Bestimmung der kinetischen Parameter der Ligationsreaktionen wurde jeweils ein Substrat im Überschuss zugegeben während die Konzentration des anderen Substrates variiert wurde. Die Konzentration der Thioestersubstrate wurde durch experimentell bestimmte Extinktionskoeffizienten bei einer Wellenlänge von 215 nm ermittelt. Die Konzentration der Produkte wurde durch Vergleich mit linearen synthetischen Standards, die die gleiche Aminosäuresequenz besitzen, bestimmt. Hierbei wurde angenommen, dass der Extinktionskoeffizient von Peptidylthioestern dem von hydrolysierten und zyklisierten Peptid gleicher Sequenz entspricht. Die kinetischen Assays wurden mittels RP-LCMS (Agilent 1100 MSD) an einer Nucleodur 125/2 C₁₈ (ec) Säule (Macherey and Nagel; Poren Durchmesser, 100 Å; Partikel Größe, 3 µm) mit folgendem Gradienten analysiert: Native Penta- und Dekapeptidylthioestersubstrate: 0-35 min, 5-90% MeCN/0,1% TFA in H₂O/0,1% TFA, 0,4 ml/min, 45°C; Ligationsreaktion GS5_{OH} und GS5_{NAC}: 0-45 min, 5-90% MeOH/0,1% TFA in H₂O/0,1% TFA, 0,4 mL/min, 45°C.

3.3.2 Bestimmung des Hämgehaltes von TioI

Mit diesem Experiment soll die Anzahl der an das Cytochrom P450 Enzym TioI gebundenen Häm-Gruppen bestimmt werden. Für diese Untersuchungen wurde ein Ultrospec® 3100 Spektrophotometer verwendet.

CO-Differenzspektroskopie

Diese Methode beruht auf der charakteristischen Ausbildung eines Absorptionsmaximums bei 450 nm nach der irreversiblen Bindung von Kohlenmonoxid an das Eisen der Porphyrin-Gruppe. Zur Bestimmung des Hämgehaltes wird ein Spektrum des reduzierten Cytochrom P450 (Cyp) und des reduzierten Cyp-CO-Komplex aufgenommen, und aus dem Differenzspektrum die Absorptionsänderung bei 450 nm bestimmt [Omura & Sato, 1964b].

Nach der Aufnahme eines Absorptionsspektrums (380-500 nm) von einer 5-35 µM TioI Pufferlösung in einer 200 µL-Küvette wurde eine Spatelspitze Natriumdithionit dazugegeben und erneut ein Absorptionsspektrum gemessen. Nach kurzer Zeit wurde dann mit Kohlenstoffmonoxid begast, um erneut Absorptionsspektren aufzunehmen.

Alkalische Hämopyridin Methode

Bei dieser Methode werden die Häm-Gruppen zunächst aus dem Protein Verbund gelöst, um anschließend photometrisch die Konzentration zu bestimmen [Omura & Sato, 1964a].

500 µL einer Lösung aus 5-35 µM TioI, 13,5% Pyridin und 120 µM NaOH wurden zunächst fünf Minuten inkubiert und dann zweimal je 200 µL dieser Lösung in eine Küvette gegeben. In einer Küvette wurde das Häm durch Zugabe von 4,8 mM Na₂S₂O₄ reduziert und in der anderen durch die Zugabe von 50 µM K₃[Fe(CN)₆] oxidiert. Anschließend wurden die Absorptionsspektren zwischen 400-600 nm aufgenommen und ein Differenzspektrum berechnet. Mit einem Differenzextinktionskoeffizienten von 32,4 cm⁻¹mM⁻¹ und dem Lambert-Beerschen Gesetz konnte der Hämgehalt bestimmt werden [Omura & Sato, 1964a]:

$$c = \frac{(A_{red557} - A_{ox557}) - (A_{red575} - A_{ox575})}{\epsilon \cdot d}$$

ε: Extinktionskoeffizient

d: Schichtdicke

c: Konzentration

A: Absorption

3.3.3 Differenzspektroskopie/ Substrattitrationen

Um die Bindungsaffinität verschiedener Liganden mit TioI zu bestimmen, wurden Absorptionsspektren von TioI in An- und Abwesenheit von Substrat aufgenommen. Hierbei wird die Tatsache ausgenutzt, dass sich das UV/ Vis-Spektrum des Kofaktors durch Interaktion mit einem Substrat/ Inhibitor ändert, da sich durch die Liganden-Bindung bzw. durch Verdrängung des axialen Wasserliganden die Aufspaltung der d-Orbitale des Häm-Eisens ändert. Grundsätzlich unterscheidet man zwei verschiedene Arten von Bindungen. Typ I-Spektren zeigen bei der Substratbindung eine Absorptionszunahme bei etwa 390 nm und Absorptionsabnahme bei etwa 420 nm. Diese Verschiebung wird durch eine Änderung des Low-Spin-Grundzustandes zum High-Spin-Zustand, sowie mit einem damit verbundenen Wechsel des Redoxpotentials charakterisiert. Die Absorptionsabnahme bei 390-405 nm und die Absorptionszunahme bei 425-435 nm entspricht einem Typ II-Spektrum und kann oft durch die Bindung eines freien Elektronenpaares an das Häm-Eisen erklärt werden.

Die Absorptionsspektren wurden an einem Beckman Coulter DU® 800 Spektrophotometer bei einer Konzentration von 2 μ M TioI in Hepes-Puffer (50 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7,5) aufgenommen. Für die Titrationen wurden jeweils 10 μ L, bestehend aus 2 μ M TioI mit unterschiedlichen Substratkonzentrationen, zu der Probenküvette hinzugegeben. In der Referenzküvette wurde simultan das gleiche Volumen mit 2 μ M TioI ohne Substrat zugegeben. Die Spektren wurden nach kurzer Inkubation zwischen 380 und 550 nm aufgenommen. Aus den Differenzspektren wurde anschließend die maximale Absorptionsänderung ermittelt. Anhand der *SigmaPlot-single ligand binding analysis* Software konnte mittels einer Michaelis-Menten-artigen Auftragung die Dissoziationskonstante bestimmt werden.

3.3.4 TioI-katalysierter Oxidationsassay

Cytochrom P450 Enzyme benötigen ein Partnerenzym, welches die für die Oxidation benötigten Elektronen überträgt. Da im Thiocoralin-Cluster kein offensichtliches Cytochrom P450 Partnerenzym vorhanden ist, wurden zur Elektronenübertragung käufliches Ferredoxin und Ferredoxin Reduktase aus *Spinacia oleracea* (Sigma-Aldrich) verwendet. In diesem System werden die Redoxpotentiale von NADPH zur Ferredoxin Reduktase und anschließend zum Ferredoxin und Cytochrom P450 Enzym weitergeleitet (Abb. 3.1).

In einem typischen Reaktionsansatz wurden 90-100 μ M PCP, 2-4 μ M Sfp, 100-200 μ M Trp-CoA, 1 mM MgCl₂, 1-20 μ M TioI, 5 μ M Ferredoxin, 0,1 Units Ferredoxin Reduktase und 1 mM

NADPH in Hepes-Puffer (50 mM Hepes, 150 mM NaCl) eine Stunde bei 25°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mittels RP-HPLC-ESI-MS (Agilent 1100 MSD) an einer Nucleosil 250/3 C₁₈ (ec) Säule (Macherey und Nagel; Poren Durchmesser, 120 Å; Partikel Größe, 3 µm) mit folgendem Gradienten analysiert: 0-10 min, 100% H₂O/0,1% TFA, 10-20 min, 0-40% MeCN/0,1% TFA in H₂O/0,1% TFA, 20-47 min, 40-57,3% MeCN/0,1% TFA in H₂O/0,1% TFA, 47-50 min, 57,3-95% MeCN/0,1% TFA in H₂O/0,1% TFA, 0,8 mL/min, 45°C.

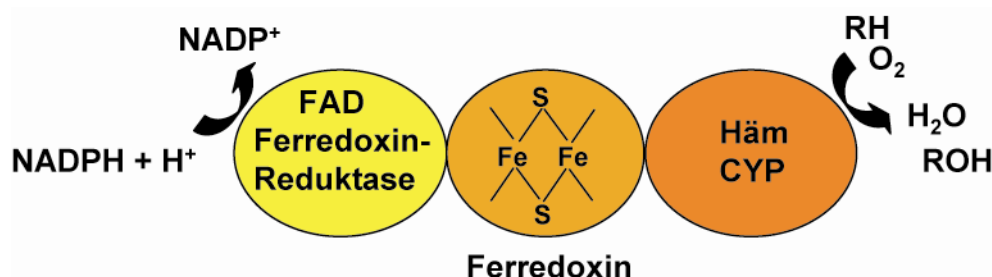


Abbildung 3.1: Übertragung der Redoxpotentiale. CYP = Cytochrom P450.

3.3.5 ATP/ PPi -Austauschreaktion

Zur Bestimmung der Aktivität und Selektivität von Adenylierungsdomänen wurde eine ATP/ PPi Austauschreaktion verwendet. Bei diesem Assay wird die Rückreaktion der A-Domäne ausgenutzt, durch die radioaktives PPi in ATP eingebaut wird. Nach erfolgter Reaktion wird das gesamte ATP des Assays über Aktivkohle absorbiert und durch Waschschrte vom radioaktiven PPi abgetrennt. Durch Bestimmung der Radioaktivität der Aktivkohle kann die Aktivität der A-Domäne bestimmt werden.

Der Reaktionsmix (100-500 µL) enthielt 1 mM ATP, 0-1 mM DTT, 5 mM NaPPi, 1-10 mM Substrat (Amino- oder Arylsäure), 2-100 µM Enzym und 0,15-0,25 µCi PPi. Als Kontrolle diente der gleiche Ansatz ohne Enzym oder ohne Substrat. Nach 5-50 min bei 25-37°C wurde die Reaktion durch die Zugabe von 500-750 µL Aktivkohlelösung (100 mM NaPPi, 560 mM HClO₄, 1,2% (w/v) Aktivkohle Norit A) abgestoppt. Nach zweimaligem Waschen mit 1 mL H₂O (Vortexieren, Zentrifugieren bei 13.000 Upm 3 min, Absaugen des Überstandes) wurde der Aktivkohlerückstand in 750 µL H₂O resuspendiert und mit 3,5 oder 15 mL Scintillisationslösung (Rotiszint Eco Plus) versetzt und die Aktivität bestimmt.

3.3.6 Präparation und Reinigung von beladenem PCP

Ein Reaktionsmischung (1-3 mL) mit 200-300 μM PCP, 300-500 μM CoA-Substrat, 1 mM MgCl_2 und 4 μM Sfp wurde eine Stunde bei 33°C inkubiert. Anschließend wurde die Mischung auf einen Anionenaustauscher (HiTrapTM QFF) mit Hepes-Puffer (50 mM Hepes, 100 mM NaCl, pH 7,5) aufgetragen. Das beladene PCP bindet hierbei nicht an die Säule und kann direkt im Durchfluss gefunden werden. Um Restanteile von Trp-CoA zu entfernen, wurde anschließend eine Umpufferung (NAP-10, *GE Healthcare*) mit Hepes-Puffer (50 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7,5) vorgenommen. Die vollständige Reinheit und Beladung der PCP-Domäne wurde per SDS-PAGE und RP-HPLC-ESI-MS kontrolliert. Zur Analyse wurde eine Nucleosil 250/3 C₁₈ (ec) Säule (Macherey und Nagel; Poren Durchmesser, 120 Å; Partikel Größe, 3 μm) mit folgendem Gradienten verwendet: 0-10 min, 100% H₂O/0,1% TFA, 10-20 min, 0-40% MeCN/0,1% TFA in H₂O/0,1% TFA, 20-47 min, 40-57,3% MeCN/0,1% TFA in H₂O/0,1% TFA, 47-50 min, 57,3-95% MeCN/0,1% TFA in H₂O/0,1% TFA, 0,8 mL/min, 45°C.

Die Konzentration konnte nach Ankonzentration mittels Viva-Spin-Säulen mit dem für beladenes PCP errechneten Extinktionskoeffizienten bei 280 nm bestimmt werden.

3.3.7 TioG-katalysierter Aminotransferasenassay

Aminotransferasen übertragen die Aminogruppe einer Aminosäure auf eine α -Ketosäure unter Verwendung des Kofaktors Pyridoxalphosphat (PLP). Als erster Schritt der Katalyse wird die Aminogruppe auf das PLP übertragen und anschließend wird der Kofaktor durch die Abgabe der Aminogruppe auf die α -Ketosäure regeneriert.

Zur Überprüfung der Aktivität von TioG wurden ungefähr 15 μM TioF/ TioG, 1 mM Kynurenin, 2 mM Pyruvat und 62,5 μM Pyridoxalphosphat über Nacht bei 25°C in Hepes-Puffer (50 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7,5) inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mittels RP-HPLC-ESI-MS (Agilent 1100 MSD) an einer Nucleosil 250/3 C₁₈ (ec) Säule (Macherey und Nagel; Poren Durchmesser, 120 Å; Partikel Größe, 3 μm) mit folgendem Gradienten analysiert: 0-10 min, 100% H₂O/0,1% TFA, 10-20 min, 0-40% MeCN/0,1% TFA in H₂O/0,1% TFA, 20-47 min, 40-57,3% MeCN/0,1% TFA in H₂O/0,1% TFA, 47-50 min, 57,3-95% MeCN/0,1% TFA in H₂O/0,1% TFA, 0,8 mL/min, 45°C.

3.3.8 TioF-katalysierter Oxidationsassay

Tryptophan-2,3-Dioxygenasen katalysieren die oxidative Indolring-Öffnung des Tryptophans. Hierbei werden entgegen den Monooxygenasen zwei Sauerstoffmoleküle auf das Substrat übertragen.

In einem typischen Reaktionsansatz wurden ungefähr 15 μM TioF/ TioG, 200 μM Na-Ascorbat und 1 mM Substrat über Nacht bei 25°C in Hepes-Puffer (50 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7,5) inkubiert. Im Falle des Indol-3-Carboxaldehyds als Substrat, wurden 10% DMSO zur Löslichkeitssteigerung hinzugefügt. Die Reaktion wurde mittels RP-HPLC-ESI-MS (Agilent 1100 MSD) an einer Nucleosil 250/3 C₁₈ (ec) Säule (Macherey und Nagel; Poren Durchmesser, 120 Å; Partikel Größe, 3 μm) mit folgendem Gradienten analysiert: 0-10 min, 100% H₂O/0,1% TFA, 10-20 min, 0-40% MeCN/0,1% TFA in H₂O/0,1% TFA, 20-47 min, 40-57,3% MeCN/0,1% TFA in H₂O/0,1% TFA, 47-50 min, 57,3-95% MeCN/0,1% TFA in H₂O/0,1% TFA, 0,8 mL/min, 45°C.

Für die Umsetzung von PCP-gebundenem Tryptophan wurden 15 μM TioF/ TioG, 200 μM Na-Ascorbat zusammen mit 90-100 μM PCP, 2 μM Sfp, 150 μM Trp-CoA und 1 mM MgCl₂ bei 25°C in Hepes-Puffer (50 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7,5) inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mittels RP-HPLC-ESI-MS (Agilent 1100 MSD) an einer Nucleosil 250/3 C₁₈ (ec) Säule (Macherey und Nagel; Poren Durchmesser, 120 Å; Partikel Größe, 3 μm) mit folgendem Gradienten analysiert: 0-10 min, 100% H₂O/0,1% TFA, 10-20 min, 0-40% MeCN/0,1% TFA in H₂O/0,1% TFA, 20-47 min, 40-57,3% MeCN/0,1% TFA in H₂O/0,1% TFA, 47-50 min, 57,3-95% MeCN/0,1% TFA in H₂O/0,1% TFA, 0,8 mL/min, 45°C.

3.3.9 Gewinnung von N'-Formylkynurenin

N'-Formylkynurenin wurde zunächst enzymatisch, wie in Abschnitt 3.3.8 beschrieben gebildet. Anschließend wurden mehrere Reaktionsansätze vereinigt und über eine präparative C₁₈ (ec) Säule mit folgendem Gradienten gereinigt: 0-5 min, 100% H₂O, 5-25 min, 0-30% MeCN in H₂O, 25-30 min, 30-95% MeCN in H₂O, 18 ml/min. Anschließend wurden die N'-Formylkynurenin enthaltenen Fraktionen lyophilisiert.

3.3.10 Proteinidentifikation

Zur Identifikation der heterolog exprimierten Proteine wurde eine massenspektrometrische Fingerprintanalyse eines tryptischen Verdaues verwendet. Diese Arbeiten wurden in der

Routineanalytik des Fachbereichs Chemie der Philipps-Universität Marburg durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mittels der Datenbank MASCOT.

3.4 Festphasenpeptidsynthese und Organische Synthese

3.4.1 Festphasenpeptidsynthese

Die von Merrifield 1963 eingeführte Festphasensynthese (engl.: *solid phase peptide synthesis*, SPPS) von Peptiden ermöglicht eine schnelle, einfache und effiziente Möglichkeit zur Darstellung von Peptiden. Die in dieser Arbeit synthetisierten Peptide wurden mit einem Synthesizer der Firma Advanced ChemTech dargestellt. Hierbei wurde die Fmoc-basierte SPPS angewendet. Im Gegensatz zur Merrifield-SPPS arbeitet die Fmoc-basierte SPPS unter milderen Reaktionsbedingungen und umgeht die Anwendung hochkonzentrierter Flusssäure. Neuere Verfahren der SPPS bedienen sich der Mikrowellentechnik [Kappe & Stadler, 2005].

Das Prinzip der Fmoc-basierten SPPS beruht auf der Orthogonalität von Schutzgruppen. So wird die basenlabile Fmoc-Schutzgruppe am N-Terminus der Aminosäuren verwendet und basenstabile Schutzgruppen für die Schützungen der Seitenketten.

Die Initiation der Peptidsynthese beginnt mit der Kupplung der ersten Aminosäure an das Harz, bzw. an den auf der Harzoberfläche gebundenen 2-Chlorotriylchlorid-Linker. Für die Kupplung der nächsten Aminosäure muss der N-Terminus zunächst durch die Base Piperidin entschützt werden. Nach Waschschritten erfolgt die Kupplung des nächsten Bausteines, der *in situ* mittels HBTU am C-Terminus für die Peptidbindungsknüpfung aktiviert wird. Nach n-facher Wiederholung dieser Propagationsschritte erfolgt die Kupplung der letzten Aminosäure. Die letzte Aminosäure verfügte nicht über die basenlabile Fmoc-Schutzgruppe, sondern diese wurde durch eine N-terminale tBoc-Schutzgruppe ersetzt. Dies ist notwendig, da die Thioester-Kupplung als nächster Schritt im Basischen durchgeführt wurde. Erst anschließend sollte der N-Terminus entschützt werden.

Die Abspaltung des vollständig Seitenketten- und N-terminal-geschützten Peptids vom 2-Chlorotriylchlorid-Linker wird durch Zugabe eines Gemisches aus AcOH/ TFE/ DCM erreicht. Unter diesen leicht sauren Bedingungen erfolgt die Abspaltung vom Harz, jedoch nicht die Seitenketten-Entschützungen. Nach dem Abtrennen des Peptids vom Harz erfolgte die Reinigung durch dreifache Umkristallisation in Hexan.

3.4.2 Thioestersynthesen

Die Thioestersynthese wurde in dieser Arbeit zum Einen für die Aktivierung von Peptiden als auch zur Aktivierung einzelner Bausteine/ Aminosäuren verwendet. Zur Synthese der Thioester wurde der C-Terminus durch das Aktivierungsreagenz PyBOP aktiviert. Der gebildete Aktivester kann im zweiten Reaktionsschritt von der durch zugesetzte Base deprotonierten Thiolgruppe nukleophil angegriffen werden.

Darstellung der Peptidyl-Thiophenole und Peptidyl-SNACs

1 eq des Seitenketten- und N-terminal geschützten Peptids, 1,2 eq PyBOP und 2 eq Thiophenol/ N-Acetylcysteamin wurden in DMF gelöst. Nach fünf-minütigem Rühren bei RT wurde die Base DIPEA dazugegeben und weiter 30 min bei RT gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde das Produkt unaufgereinigt für die Entschützung eingesetzt.

Darstellung der CoA-Thioester

1 eq des Seitenketten- und N-terminal geschützten Peptides oder der Aminosäure, 1,2 eq PyBOP und 1 eq CoA wurden in DMF gelöst. Nach fünf-minütigem Rühren bei RT wurde die Base DIPEA dazugegeben und weiter 2 h bei RT gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde das Produkt direkt für die Entschützung eingesetzt.

3.4.3 Terminale Entschützung der thioesteraktivierten Aminosäuren und Peptide

Das getrocknete Produkt wurde in einer Mischung aus TFA/ H₂O/ TIPS (95/ 2,5/ 2,5) gelöst und 0,5-1 h bei RT gerührt und anschließend in kaltem Diethylether durch Zutropfen ausgefällt. Nach Zentrifugation (4000 Upm, 4°C, 5 min) wurde der Überstand abgetrennt und der Feststoff bei -20°C gelagert. Anschließend wurde das Produkt durch RP-Chromatographie gereinigt und isoliert.

3.4.4 Reinigung mittels präparativer HPLC

Zur Isolierung des gewünschten Syntheseproduktes wurde das Rohprodukt an einer C₁₈-*reversed-phase*-Säule gereinigt. Die Reinigung erfolgte mittels eines linearen Acetonitril (0,1% TFA)/Wasser (0,1% TFA)-Gradienten. Das verwendete Gerät der Firma Agilent erlaubt durch einen UV-Detektor (215 nm) eine automatische Peakerkennung. Die so gesammelten Fraktionen

wurden Massenspektrometrisch identifiziert und das gesuchte Produkt durch Gefriertrocknung der entsprechenden Fraktionen erhalten.

4. Ergebnisse

4.1 Charakterisierung der iterativen Gramicidin S-Thioesterase

Der iterative Charakter einer NRPS wird im Wesentlichen durch die Terminationsreaktion bestimmt. Dieser häufig durch TE-Domänen katalysierte Schritt beinhaltet neben der Zyklisierung auch eine Oligomerisierung von gleichen Peptidmonomeren. Der Mechanismus der iterativen Thioesterasen war zu Beginn dieser Arbeit kaum untersucht worden. Des Weiteren war es von besonderem Interesse zu ergründen, welche Eigenschaften iterative Thioesterasen haben, und in wieweit man diese Eigenschaften für die chemoenzymatische Synthese von zyklischen Strukturen nutzen kann.

4.1.1 Expression der iterativen Gramicidin S-Thioesterase

Zur Charakterisierung der iterativen Gramicidin S-Thioesterase aus *Bacillus brevis* wurde das didomänale *grsB* PCP-TE in den pBAD202/D-TOPO-Vektor kloniert. Die Expression des Thioedoxin-Fusionsproteins GrsB PCP-TE in *E. coli* und die anschließende Reinigung mittels Ni-NTA-Chromatographie lieferte das *apo*-Protein in guter Reinheit und in löslicher Form (Abb. 4.1).

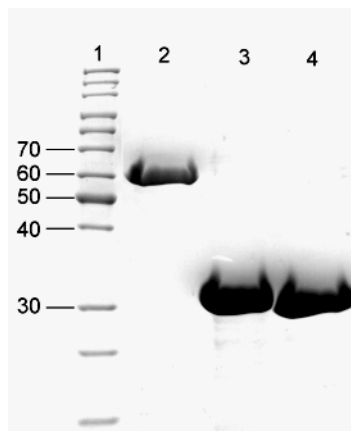


Abbildung 4.1: 12,5% SDS-PAGE der rekombinanten Thioesterasen. Position 1: Protein Marker (Fermentas); Position 2: GrsB PCP-TE (59 kDa); Position 3: GrsB TE_{Lang} (33 kDa); Position 4: GrsB TE_{Kurz} (30 kDa).

Um einen eventuellen Einfluss der PCP-Domäne an der Dimerisierungsreaktion auszuschließen, sollte zusätzlich die einzelständige TE-Domäne kloniert werden. Durch Sequenz-Alignments

wird deutlich, dass die GrsB TE gegenüber den meisten Thioesterasen einen verlängerten N-Terminus besitzt (Abb. 4.2). Werden die ersten etwa zehn nicht konservierten Aminosäuren des Alignments dem Linkerbereich zugesprochen, ergibt sich eine 25 Aminosäuren große Extension, die in den meisten TE-Domänen nicht vorhanden ist (Definition Linkerbereich nach [Doekel, 2000]). Ausgehend hiervon wurden zwei Thioesterase-Konstrukte kloniert. Das erste Konstrukt kodiert die TE-Domäne mit dem beschriebenen vergrößerten N-Terminus [GrsB TE_{Lang} (pQE60-Vektor)]. Dem zweiten Konstrukt fehlen hingegen diese 25 Aminosäuren [GrsB TE_{Kurz} (pCL11-Vektor)]. Beide rekombinanten Proteine konnten nach der Expression in *E. coli* und anschließender Reinigung über Ni-NTA-Chromatographie in löslicher Form erhalten werden (Abb. 4.1).

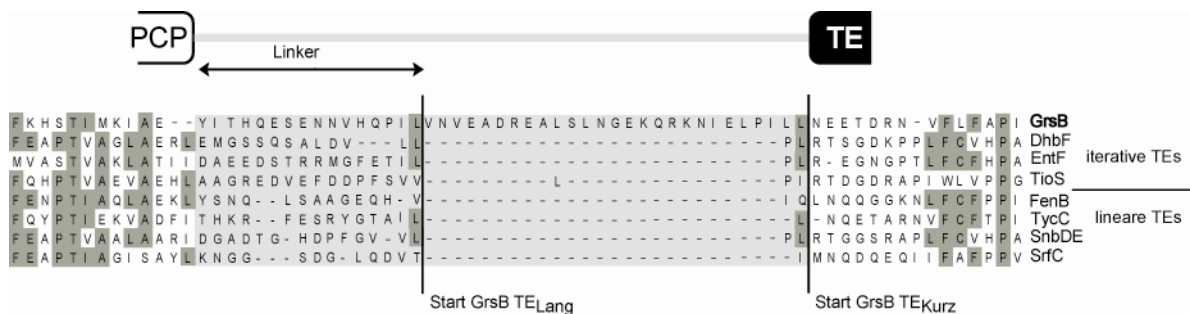


Abbildung 4.2: Sequenz-Alignment linearer und iterativer Thioesterasen (TEs). GrsB = Gramicidin S-Synthetase B; DhbF = Bacillibactin-Synthetase F; EntF = Enterobactin-Synthetase F; TioS = Thiocoralin-Synthetase S; FenB = Fengycin-Synthetase B; TycC = Tyrocidin-Synthetase C; SnbDE = Pristinamycin-Synthetase DE; SrfC = Surfactin-Synthetase C.

4.1.3 Substratsynthese

Zur Charakterisierung der Gramicidin S-Thioesterase wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene SNAC- oder Thiophenol-aktivierte Peptidylsubstrate synthetisiert (siehe Abschn. 3.4). Die Reinheit sowie die Identität dieser Substrate wurde massenspektrometrisch (LC-ESI-MS) kontrolliert (Tab. 4.1). Der Name der einzelnen Substrate setzt sich aus dem Kürzel GS mit der Anzahl der Aminosäuren im Peptid zusammen. Zusätzliche Informationen über das Peptid werden in klein gedruckter Form dargestellt.

Substrate	Sequenzen	Beobachtete Masse (Kalkulierte Masse)/ [M+H] ⁺
GS2	D-Phe ₁ - L-Leu ₂ - SNAC	380,2 (380,2)
GS3	D-Phe ₁ - L-Pro ₂ - L-Leu ₃ - SNAC	477,2 (477,3)
GS4	D-Phe ₁ - L-Pro ₂ - L-Orn ₃ - L-Leu ₄ - SNAC	591,2 (591,3)
GS5_{SNAC}	D-Phe ₁ - L-Pro ₂ - L-Val ₃ - L-Orn ₄ - L-Leu ₅ - SNAC	690,5 (690,4)
GS5_{SPh}	D-Phe ₁ - L-Pro ₂ - L-Val ₃ - L-Orn ₄ - L-Leu ₅ - SPh	681,5 (681,4)
GS5_{Ala2}	D-Phe ₁ - L-Ala ₂ - L-Val ₃ - L-Orn ₄ - L-Leu ₅ - SNAC	664,5 (664,4)
GS5_{Ala3}	D-Phe ₁ - L-Pro ₂ - L-Ala ₃ - L-Orn ₄ - L-Leu ₅ - SNAC	662,5 (662,4)
GS5_{Ala4}	D-Phe ₁ - L-Pro ₂ - L-Val ₃ - L-Ala ₄ - L-Leu ₅ - SNAC	647,4 (647,4)
GS5_{L-Phe1}	D-Phe ₁ - L-Pro ₂ - L-Val ₃ - L-Orn ₄ - L-Leu ₅ - SNAC	690,5 (690,4)
GS5_{D-Leu5}	D-Phe ₁ - L-Pro ₂ - L-Val ₃ - L-Orn ₄ - D-Leu ₅ - SNAC	690,5 (690,4)
GS5_{NAc}	NAc-D-Phe ₁ - L-Pro ₂ - L-Val ₃ - L-Orn ₄ - L-Leu ₅ - SNAC	732,4 (732,4)
GS5_{OH}	D-Phe ₁ - L-Pro ₂ - L-Val ₃ - L-Orn ₄ - L-Leu ₅	589,4 (589,4)
GS6	D-Phe ₁ - L-Pro ₂ - L-Val ₃ - L-Val ₄ - L-Orn ₅ - L-Leu ₆ - SNAC	789,5 (789,5)
GS7	D-Phe ₁ - L-Pro ₂ - L-Val ₃ - L-Pro ₄ - L-Val ₅ - L-Orn ₆ - L-Leu ₇ - SNAC	886,5 (886,5)
GS7_{Ala6-7}	D-Phe ₁ -L-Pro ₂ -L-Val ₃ -L-Orn ₄ -L-Leu ₅ -L-Ala ₆ -L-Ala ₇	731,4 (731,4)
GS8	D-Phe ₁ - L-Pro ₂ - L-Val ₃ - L-Orn ₄ - L-Pro ₅ - L-Val ₆ - L-Orn ₇ - L-Leu ₈ - SNAC	1000,6 (1000,6)
GS9	D-Phe ₁ - L-Pro ₂ - L-Val ₃ - L-Orn ₄ - L-Leu ₅ - L-Pro ₆ - L-Val ₇ - L-Orn ₈ - L-Leu ₉ - SNAC	1113,8 (1113,7)
GS10	D-Phe ₁ - L-Pro ₂ - L-Val ₃ - L-Orn ₄ - L-Leu ₅ - D-Phe ₆ - L-Pro ₇ - L-Val ₈ - L-Orn ₉ - L-Leu ₁₀ - SNAC	1260,7 (1260,7)
GS10_{L-Phe1}	L-Phe ₁ - L-Pro ₂ - L-Val ₃ - L-Orn ₄ - L-Leu ₅ - D-Phe ₆ - L-Pro ₇ - L-Val ₈ - L-Orn ₉ - L-Leu ₁₀ - SNAC	1260,7 (1260,7)
GS10_{D-Leu10}	D-Phe ₁ - L-Pro ₂ - L-Val ₃ - L-Orn ₄ - L-Leu ₅ - D-Phe ₆ - L-Pro ₇ - L-Val ₈ - L-Orn ₉ - D-Leu ₁₀ - SNAC	1260,7 (1260,7)

Substrate	Sequenzen	Beobachtete Masse (Kalkulierte Masse)/ [M+H] ⁺
GS10_{Ala2,7}	D-Phe ₁ - L-Ala ₂ - L-Val ₃ - L-Orn ₄ - L-Leu ₅ - D-Phe ₆ - L-Ala ₇ - L-Val ₈ - L-Orn ₉ - L-Leu ₁₀ - SNAC	1208,7 (1208,7)
GS10_{Ala3,8}	D-Phe ₁ - L-Pro ₂ - L-Ala ₃ - L-Orn ₄ - L-Leu ₅ - D-Phe ₆ - L-Pro ₇ - L-Ala ₈ - L-Orn ₉ - L-Leu ₁₀ - SNAC	1204,7 (1204,7)
GS10_{Ala4,9}	D-Phe ₁ - L-Pro ₂ - L-Val ₃ - L-Ala ₄ - L-Leu ₅ - D-Phe ₆ - L-Pro ₇ - L-Val ₈ - L-Ala ₉ - L-Leu ₁₀ - SNAC	1174,7 (1174,7)
GS10_{Ala1-5}	L-Ala ₁ -L-Ala ₂ -L-Ala ₃ -L-Ala ₄ -L-Ala ₅ -D-Phe ₆ -L-Pro ₇ - L-Val ₈ -L-Orn ₉ -L-Leu ₁₀ -SNAC	1045,7 (1045,6)

Tabelle 4.1: ESI-MS-Daten der synthetisierten Peptidylsubstrate.

4.1.4 Umsetzung des nativen Penta- und Dekapeptides

Zur Aktivitätsüberprüfung von GrsB PCP-TE wurde dieses zunächst mit den Substraten, die der natürlichen Sequenz von Gramicidin S (cyclo(-D-Phe₁- L-Pro₂- L-Val₃- L-Orn₄- L-Leu₅-)₂) entsprechen, inkubiert. Das Gramicidin Dekapeptid (D-Phe₁- L-Pro₂- L-Val₃- L-Orn₄- L-Leu₅- D-Phe₆- L-Pro₇- L-Val₈- L-Orn₉- L-Leu₁₀- SNAC, GS10), welches am C-Terminus als SNAC aktiviert ist, wurde hierbei, wie bereits beschrieben, zyklisiert (Abb. 4.3) [Kohli *et al.*, 2001]. Iterative Thioesterasen katalysieren *in vivo* vor der finalen Zyklisierung eine Dimerisierung. Dieses sollte auch *in vitro* gezeigt werden. Hierzu wurden zwei Pentapeptide auf Basis der nativen Gramicidin S Sequenz synthetisiert. Die Aktivierung des C-Terminus erfolgte durch SNAC (GS5_{SNAC}) und durch Thiophenol (GS5_{SPh}). Nach Inkubation von GS5_{SNAC} mit GrsB PCP-TE konnte neben dem Hauptprodukt Gramicidin S (5+5) sowohl Hydrolyse als auch geringe Mengen eines linearen Dekapeptidyl-SNAC (5+5) und eines Fünfzehnrings (5+5+5) detektiert werden (Hydrolyse/ Gramicidin S: 1/4; Abb. 4.3). Da im linearen Gramicidin S Vorläufer zwei Nukleophile vorhanden sind (N-Terminus D-Phe₁ und L-Orn₄) und somit auch die Zyklisierung über verschiedene Nukleophile stattfinden könnte, wurde die Konnektivität des Zehnerzyklus mittels MS/ MS-Sequenzierung überprüft. Hierbei zeigte sich, dass die Ligation ausschließlich über D-Phe und nicht über L-Orn stattgefunden hat (siehe Anhang 6.2). Im Falle des Thiophenol-aktivierten Pentapeptides GS5_{SPh} konnte eine leicht erhöhte Hydrolyse neben dem Hauptprodukt Gramicidin S gefunden werden (Hydrolyse/ Gramicidin S: 1/3). Interessanterweise bildete sich in

diesen Assays in einer Enzym-unabhängigen Reaktion auch ein Fünfring. Die MS/MS-Sequenzierung dieses Fünfringes zeigte auch hier die Konnektivität von D-Phe und L-Leu. Der Vergleich zwischen dem Assay mit Enzym und dem ohne Enzym zeigte, dass die enzymkatalysierte Reaktion schneller als die Fünfringbildung ist. Weiterhin konnten für alle Reaktionen die in Tabelle 4.2 angegebenen kinetischen Parameter bestimmt werden. Diese Ergebnisse zeigen sehr deutlich, dass die Gramicidin-Thioesterase auch *in vitro* in der Lage ist die Ligation und die Zyklisierung zu katalysieren.

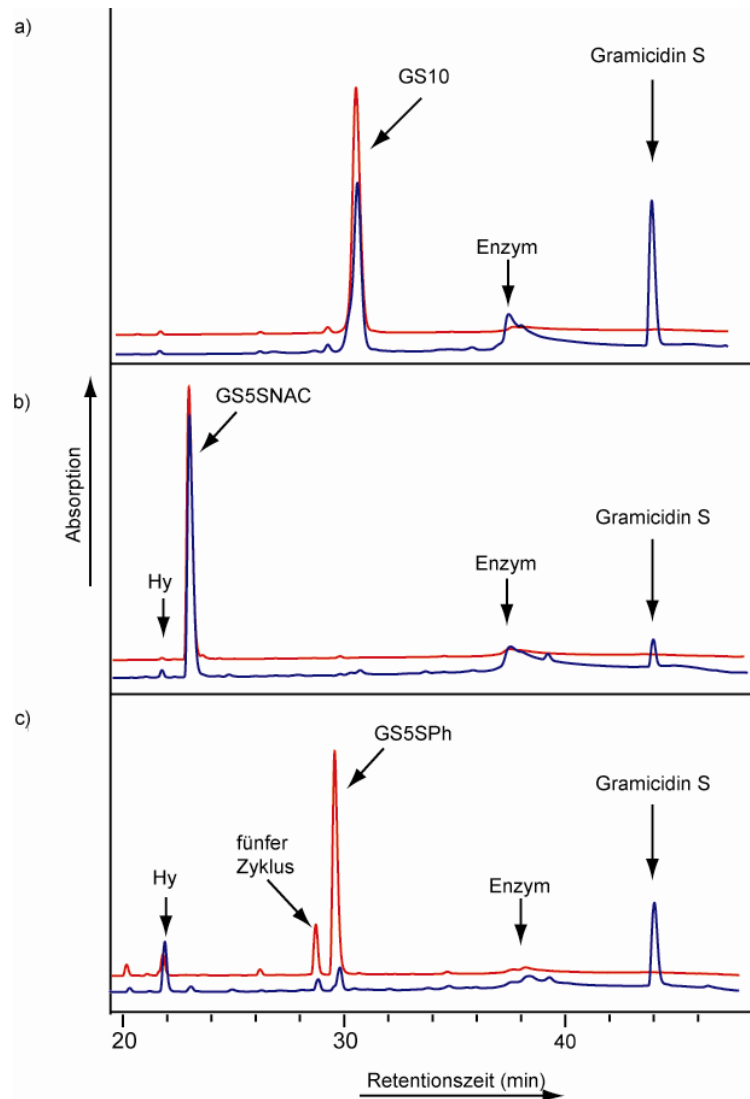


Abbildung 4.3: Dimerisierung und Zyklisierung von GS5_{SPH}, GS5_{SNAC} und GS10. In den Assays wurden jeweils 300 μ M Substrat mit 10 μ M GrsB PCP-TE 1 h inkubiert. a) Inkubation von GS10. b) Inkubation von GS5_{SNAC}. c) Inkubation von GS5_{SPH}. Das blaue UV-Chromatogram entspricht dem Assay ohne GrsB PCP-TE und das rote der Reaktion mit GrsB PCP-TE.

Weiterhin wurden auch die beiden einzelständigen Thioesterasen (GrsB TE_{Lang} und GrsB TE_{Kurz}) mit den nativen SNAC-aktivierten Penta- und Dekapeptiden inkubiert. Auch hier konnten die gleichen Produktverhältnisse wie mit GrsB PCP-TE gefunden werden. Wird die zeitabhängige Umsetzung von GS5_{SNAC} und GS10 der Enzyme miteinander verglichen, so fällt auf, dass GrsB PCP-TE und GrsB TE_{Lang} ähnliche Produktbildungsgeschwindigkeiten besitzen, wohingegen GrsB TE_{Kurz} die Umsetzung fünfmal langsamer katalysiert. Für alle weiteren beschriebenen Versuche wurde GrsB PCP-TE als Katalysator verwendet.

Substrat	Kinetische Parameter für die Gramicidin S Bildung
GS10	$K_M = 0,24 \text{ mM}$ $k_{cat} = 1,3 \text{ min}^{-1}$ $k_{cat}/K_M = 5,5 \text{ min}^{-1} \text{ mM}^{-1}$
GS5 _{SNAC}	$k_{cat} = 0,4 \text{ min}^{-1}$
GS5 _{SPh}	$k_{cat} = 2,4 \text{ min}^{-1}$

Tabelle 4.2: Kinetische Parameter der GrsB PCP-TE katalysierten Gramicidin S Bildung mit verschiedenen Substraten.

Substrat	Reaktionsprodukt	Beobachtete Masse (Kalkulierte Masse)/ [M+H] ⁺
GS10	Hydrolyse Monomer	1159,7 (1159,7)
	Zyklus Monomer (Gramicidin S)	1141,7 (1141,7)
GS5 _{SNAC}	Hydrolyse Monomer	589,4 (589,4)
	Dimer-SNAC	1260,7 (1260,8)
	Zyklus Dimer (Gramicidin S)	1141,7 (1141,7)
	Zyklus Trimer	1712 (1712,1)
GS5 _{SPh}	Hydrolyse Monomer	589,5 (589,4)
	Zyklus Monomer	571,5 (571,4)
	Zyklus Dimer (Gramicidin S)	1141,7 (1141,7)

Tabelle 4.3: ESI-MS-Daten der Reaktionsprodukte.

4.1.5 Substratspezifität von GrsB PCP-TE

Zur Charakterisierung und zur Einschätzung des biokombinatorischen Potentials der iterativen Gramacidin S-Thioesterase sollte in weiteren Versuchen die Substratspezifität bestimmt werden. In früheren Publikationen konnte bereits gezeigt werden, dass sich die iterative Thioesterase in Bezug auf die Zyklisierung ähnlich verhält, wie viele Thioesterasen von linearen NRPS (siehe Abschn. 1.3). So konnte die Zyklisierung auch nach Austausch einzelner interner Aminosäuren im nativen Dekapeptidvorläufer beobachtet werden [Wu *et al.*, 2003]. Um den Einfluss einzelner Aminosäuren auf die Ligationsreaktion mit der anschließenden Zyklisierung bewerten zu können, wurden in der Pentapeptidsequenz Aminosäuren gegen Alanin ersetzt. Der Austausch der Positionen zwei (L-Pro₂), drei (L-Val₃) und vier (L-Orn₄) gegen L-Alanin führte nach Inkubation mit GrsB PCP-TE jeweils zu den korrespondierenden linearen SNAC-Intermediaten, sowie zu dem Zehnerzyklus als auch zu dem Fünfehnerzyklus (Tab. 4.4). Folgende Verhältnisse zwischen Hydrolyse zu den Reaktionsprodukten (Ligations- und Zyklisierungsprodukte) konnten für die Reaktionen bestimmt werden: GS5_{SNAC} 1/4; GS5_{Ala2} 1/2,5; GS5_{Ala3} 6/1; GS5_{Ala4} 1/1,5. Die Reaktionsgeschwindigkeit der Substratumsetzungen war bei allen Substraten ähnlich, wobei das native Substrat am schnellsten umgesetzt wurde (Substratabnahme nach 10 min: GS5_{SNAC} 11%, GS5_{Ala2} 6%, GS5_{Ala3} 9% und GS5_{Ala4} 9%). Interessanterweise konnten in den Assays unterschiedliche Verhältnisse des Zehnerzyklus zum Fünfehnerzyklus festgestellt werden (Verhältnis: GS5_{SNAC} 6/1, GS5_{Ala2} 5/1, GS5_{Ala3} 2/1 und GS5_{Ala4} nb.). Zur Untermauerung dieser Ergebnisse wurden die korrespondierenden linearen Dekapeptidyl-SNAC Substrate synthetisiert und mit GrsB PCP-TE inkubiert. Für GS10_{Ala2,7} und GS10_{Ala3,8} konnten die kinetischen Parameter bestimmt werden, wohingegen GS10_{Ala4,9} aufgrund von Löslichkeitsproblemen nicht vermessen werden konnte (GS10_{Ala2,7}: $K_M = 357 \mu\text{M}$, $k_{cat} = 4,0 \text{ min}^{-1}$ und GS10_{Ala3,8}: $K_M = 485 \mu\text{M}$, $k_{cat} = 3,4 \text{ min}^{-1}$).

Weiterhin wurde der Einfluss der Konfiguration auf die Dimerisierungs- und die Zyklisierungsreaktion untersucht. Hierzu wurde die Konfiguration der C-terminalen sowie der N-terminalen Aminosäure vertauscht. Substrate, die am C-Terminus D-Leu anstelle L-Leu trugen (GS5_{D-Leu5} und GS10_{D-Leu10}), zeigten kaum Hydrolyse, während Substrate, die am N-Terminus L-Phe anstelle von D-Phe trugen, stärker hydrolysiert wurden (GS5_{L-Phe1} und GS10_{L-Phe1}). Zyklisierung und Dimerisierung konnte mit keinem dieser Substrate beobachtet werden.

Substrat	Reaktionsprodukt	Beobachtete Masse (Kalkulierte Masse)/ [M+H] ⁺
GS5 _{Ala2}	Hydrolyse Monomer	563,5 (563,4)
	Dimer-SNAC	1208,7 (1208,7)
	Zyklus Dimer	1089,8 (1089,7)
	Zyklus Trimer	1633,9 (1634,0)
GS5 _{Ala3}	Hydrolyse Monomer	561,3 (561,3)
	Dimer-SNAC	1204,7 (1204,7)
	Zyklus Dimer	1085,5 (1085,6)
	Zyklus Trimer	1627,9 (1628,0)
GS5 _{Ala4}	Hydrolyse Monomer	546,3 (546,3)
	Dimer-SNAC	1196,5 (1196,7) [M+Na] ⁺
	Zyklus Dimer	1055,6 (1055,6)
	Zyklus Trimer	1582,9 (1582,9)
GS5 _{L-Phe1}	Hydrolyse Monomer	589,3 (589,4)
GS10 _{Ala2,7}	Hydrolyse Monomer	1107,7 (1107,7)
	Zyklus Monomer	1089,7 (1089,7)
GS10 _{Ala 3,8}	Hydrolyse Monomer	1103,7 (1103,7)
	Zyklus Monomer	1085,7 (1085,6)
GS10 _{Ala 4,9}	Hydrolyse Monomer	1073,7 (1073,7)
	Zyklus Monomer	1055,7 (1055,6)
GS10 _{L-Phe1}	Hydrolyse Monomer	1159,8 (1159,7)

Tabelle 4.4: ESI-MS-Daten der Reaktionsprodukte.

4.1.6 Umsetzung mit Substraten verschiedener Länge

Die iterative Gramicidin S-Thioesterase katalysiert die Zyklisierung eines Dekapeptidylthioester, wohingegen sie eine Dimerisierung und anschließende Zyklisierung eines Pentapeptidylthioester katalysiert. Es stellt sich also die Frage, was passiert, wenn der Thioesterase Substrate anderer Längen angeboten werden. Zur Klärung wurde eine Substratbibliothek ausgehend vom linearen Dekapeptidyl-SNAC synthetisiert. Hierbei wurde jeweils eine Aminosäure aus der Mitte der Sequenz eliminiert. Das größte Substrat dieser Reihe war folglich ein Nonapeptidyl-SNAC-

Substrat (GS9), wohingegen das kleinste ein Dipeptidyl-SNAC-Substrat (GS2) war (Sequenzen Tab. 4.1). Alle Substrate wurden in den folgenden Assays in einer Konzentration von 300 μM und GrsB PCP-TE in einer Konzentration von 10 μM eingesetzt. Nach 90 minütiger Inkubation bei 25°C wurde die Reaktion mit 4%tiger TFA abgestoppt und mittels LC-ESI-MS analysiert (Abschn. 3.3.1).

Bei der Inkubation von GS2 mit GrsB PCP-TE konnte nur sehr geringe Hydrolyse beobachtet werden. Dieses Substrat ist demnach zu klein für eine Umsetzung. Weiterhin konnte die langsame nicht enzymatische Bildung des korrespondierenden Diketopiperazins gefunden werden. Bei der Umsetzung des nächstgrößeren Substrates (GS3) mit GrsB PCP-TE konnte neben Hydrolyse die geringe Bildung eines Sechserzyklus beobachtet werden. Es erfolgte also eine Dimerisierung mit anschließender Zyklisierung des Substrates. Bei der Umsetzung des Tetrapeptidyl-SNAC (GS4) entstand hingegen ein komplexes enzymkatalysiertes Produktgemisch. Nach 90 Minuten wurde ein Drittel des Tetrapeptides umgesetzt (Abb. 4.4). Neben den beiden Hauptprodukten, einem Achterzyklus (48%, 4+4) und einem Zwölferzyklus (21%, 4+4+4) wurden die Nebenprodukte hydrolysiertes Tetrapeptid (10%), hydrolysiertes Oktapeptid (5%, 4+4) und das SNAC-aktivierte Oktapeptid (16%, 4+4) gefunden. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Thioesterase somit nicht nur in der Lage ist eine Dimerisierung sondern auch eine Trimerisierung zu katalysieren. Weitere Vergrößerungen des Substrates ergaben eine Abnahme der Tendenz Trimerisierungs- und Dimerisierungsreaktionen zu katalysieren. So konnte bei der Umsetzung des Hexapeptidylthioesters (GS6) neben Hydrolyse als Hauptprodukt ein Sechserzyklus und geringere Mengen eines Zwölferzyklus beobachtet werden. Bei der Umsetzung des Heptapeptidylthioesters (GS7) wurde neben Hydrolyse ein lineares SNAC-aktivierte 14er-Peptid (7+7) und ein 14er-Zyklus (7+7) detektiert (Abb. 4.5). In den folgenden Umsetzungen mit GS8 und GS9 konnte neben Hydrolyse der korrespondierende monomere Zyklus gefunden werden. Weiterhin konnten bei der Umsetzung mit GS8 geringe Mengen des korrespondierenden hydrolysierten Dimers (8+8) gefunden werden. Diese Substrate (GS8 und GS9) schienen zu groß für eine Dimerisierung mit anschließender Zyklisierung zu sein.

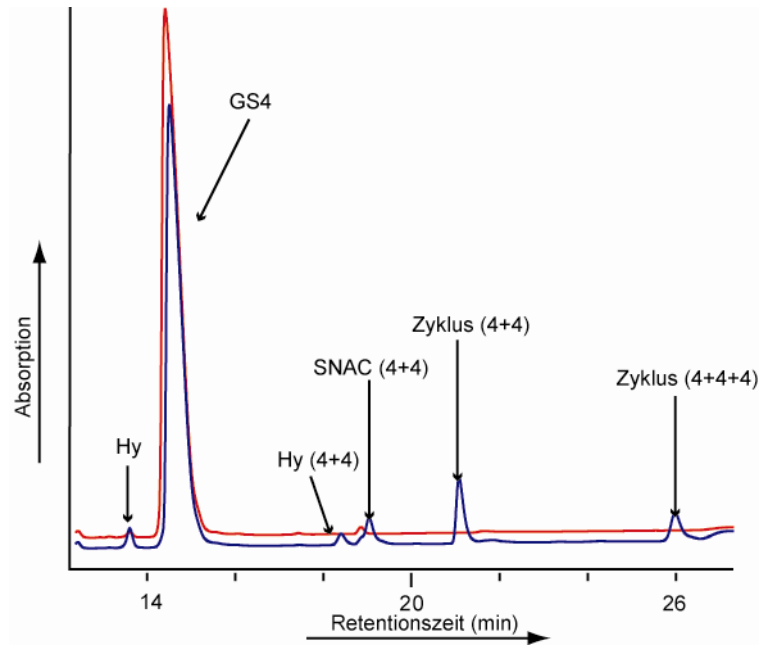


Abbildung 4.4: UV-Chromatogram der Umsetzung des Tetrapeptidyl-SNAC GS4 mit GrsB PCP-TE. Das blaue UV-Chromatogram entspricht der Umsetzung mit Enzym und das rote der ohne Enzym.

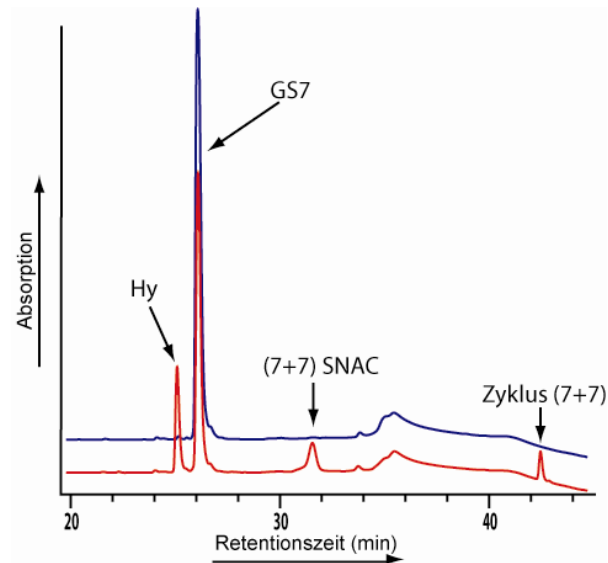


Abbildung 4.5: UV-Chromatogram der Umsetzung des Heptapeptidyl-SNAC GS7 mit GrsB PCP-TE. Das rote UV-Chromatogram entspricht der Umsetzung mit Enzym und das blaue der ohne Enzym.

Substrat	Reaktionsprodukt	Beobachtete Masse (Berechnete Masse)/ [M+H] ⁺
GS2	Hydrolyse Monomer	279,3 (279,2)
	Diketopiperazin	261,2 (261,2)
GS3	Hydrolyse Monomer	376,3 (376,3)
	Zyklus Dimer	715,5 (715,4)
GS4	Hydrolyse Monomer	490,3 (490,3)
	Hydrolyse Dimer	961,5 (961,6)
	Dimer-SNAC	1062,5 (1062,7)
	Zyklus Dimer	943,5 (943,6)
	Zyklus Trimer	1414,8 (1414,9)
GS6	Hydrolyse Monomer	688,5 (688,4)
	Zyklus Monomer	670,5 (670,4)
	Zyklus Dimer	1339,8 (1339,9)
GS7	Hydrolyse Monomer	785,5 (785,5)
	Dimer-SNAC	1652,9 (1653)
	Zyklus Dimer	1534,0 (1533,9)
GS8	Hydrolyse Monomer	899,5 (899,6)
	Hydrolyse Dimer	1780,0 (1780,2)
	Zyklus Monomer	881,5 (881,6)
GS9	Hydrolyse	1012,5 (1012,7)
	Zyklus Monomer	994,5 (994,6)

Tabelle 4.5: ESI-MS-Daten der Reaktionsprodukte.

4.1.7 Umsetzung von Mischungen aus verschiedenen Substraten

Da die iterative Gramicidin S-Thioesterase zwei Substrate miteinander ligiert und anschließend zyklisiert, sollte die Produktbreite durch Inkubation mit Substratmischungen erhöht werden. Bei der Umsetzung von GS4 mit GS5_{SNAC} konnten neben den im vorherigen Absatz beschriebenen Produkten ein neu gebildeter 13er Zyklus beobachtet werden (Abb. 4.6). Dieser Zyklus setzt sich aus zwei Tetrapeptiden und dem Pentapeptid zusammen. Korrespondierend hierzu konnte bei der

Umsetzung von GS3 und GS4 ein zusätzlicher 11er Zyklus (4+4+3) und bei der Umsetzung von GS4 mit GS6 ein neuer Zehnerzyklus (6+4) beobachtet werden.

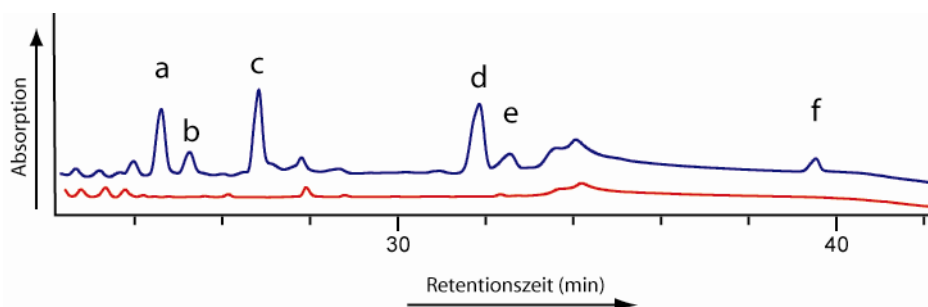


Abbildung 4.6: Inkubation der Substrate GS4 und GS5_{SNAC} mit GrsB PCP-TE. Das rote UV-Chromatogramm zeigt den Assay ohne GrsB PCP-TE und das blaue den Assay mit GrsB PCP-TE. a, Dimer-SNAC (4+4); b, Dimer (5+5); c, Zyklus Dimer (4+4); d, Zyklus Trimer (4+4+4); e, Zyklus Gemischt (5+4+4); f, Zyklus Dimer (5+5).

Substrat	Reaktionsprodukt	Beobachtete Masse (Kalkulierte Masse)/ [M+H] ⁺
GS4 mit GS5 _{SNAC}	Zyklus (4+4+5)	1513,8 (1513,9)
GS4 mit GS10	Zyklus (4+6)	1141,7 (1141,7)
GS4 mit GS3	Zyklus (4+4+3)	1300,7 (1300,8)

Tabelle 4.6: ESI-MS-Daten der neuen zyklischen Reaktionsprodukte.

4.1.8 Die Ligationsreaktion

In den vorangegangenen Absätzen wurde beschrieben, dass die iterative Gramicidin S-Thioesterase in der Lage ist eine Vielzahl unterschiedlicher Dimerisierungsreaktionen zu katalysieren. Es stellt sich also die grundsätzliche Frage, ob die GrsB-Thioesterase auch für die Katalyse von reinen Ligationsreaktionen verwendet werden kann. Um die Zyklisierungsreaktion der GrsB PCP-TE zu unterbinden, wurden zunächst geeignete Substrate synthetisiert. Hierbei sollte ein Substrat einen aktiven C-Terminus und einen inaktiven N-Terminus besitzen, wohingegen das andere Substrat umgedrehte Aktivität tragen sollte. Es wurde also ein nichtaktiviertes Pentapeptid (GS5_{OH}) und ein am C-Terminus SNAC-aktiviertes und am N-Terminus acetyliertes Substrat (GS5_{Nac}) synthetisiert (Abb. 4.7). Inkubierte man diese Substrate einzeln mit GrsB PCP-TE konnte im Falle von GS5_{OH} keine Reaktion und im Falle von

GS5_{Nac} ausschließlich Hydrolyse beobachtet werden. Wurden beide Substrate zusammen inkubiert, bildete sich neben Hydrolyse das erwünschte Ligationsprodukt, ein Dekapeptid (Verhältnis Ligation zu Hydrolyse 1/2; Abb. 4.8). Hielt man ein Substrat konstant im Überschuss, konnte die Michaelis-Menten Kinetik des anderen Substrates bestimmt werden. Für GS5_{OH} ergab sich ein K_M -Wert von 0,62 mM und für GS5_{Nac} ein K_M -Wert von 1,1 mM. Der gemittelte k_{cat} -Wert für beide Reaktionen ergibt 6,1 min⁻¹.

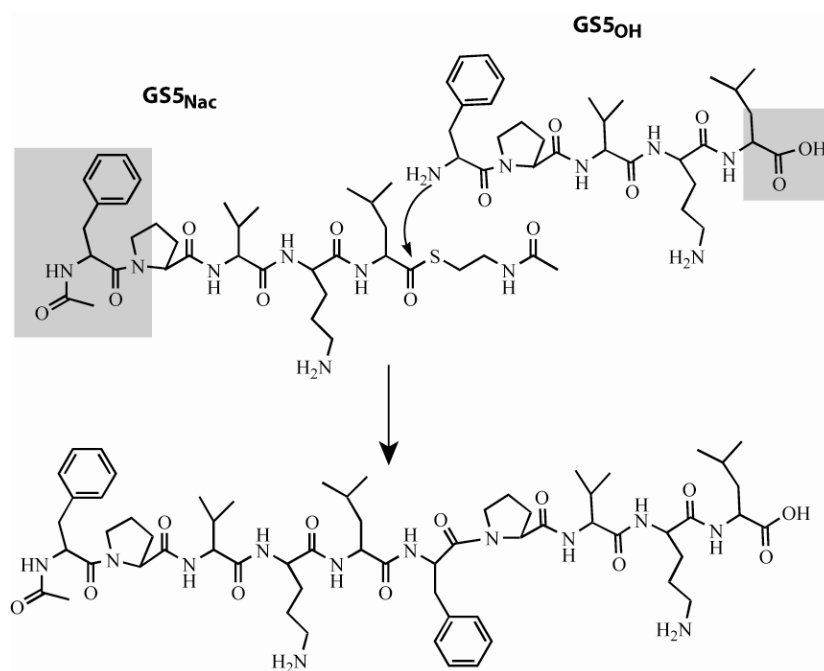


Abbildung 4.7: Ligrationsreaktion von GS5_{OH} und GS5_{Nac}. Die grau unterlegten Stellen zeigen den inaktiven N-Terminus des einen und den inaktiven C-Terminus des anderen Substrates.

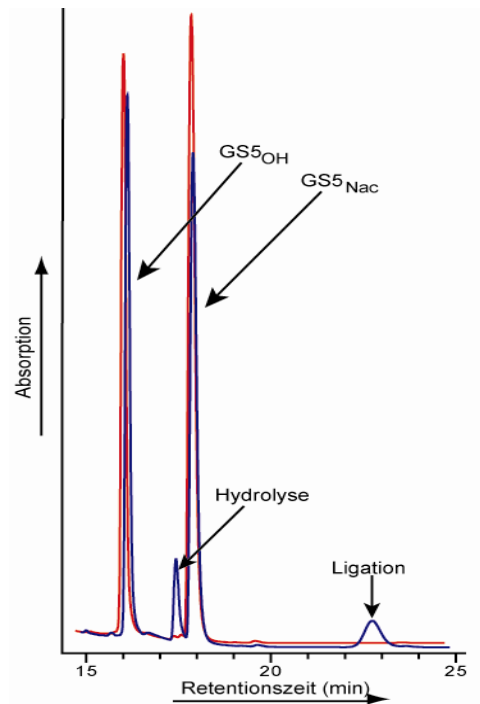


Abbildung 4.8: Ligungsreaktion von GS5_{OH} mit GS5_{Nac} katalysiert durch GrsB PCP-TE. Das rote UV-Chromatogram zeigt den Assay ohne GrsB PCP-TE und das blaue den Assay mit GrsB PCP-TE.

In weiteren Versuchen wurde dieses Ligationspotential mit verschiedenen Substraten getestet. Hierbei war von besonderem Interesse, ob auch größere Ligungsprodukte gebildet werden können.

So wurde zum einen das Dekapeptid GS10_{Ala1-5} synthetisiert an dessen N-Terminus fünf Alanine addiert wurden (L-Ala- L-Ala- L-Ala- L-Ala- L-Ala- D-Phe- L-Pro- L-Val- L-Orn- L-Leu- SNAC). Da über L-Alanin keine TE-Domänen katalysierte Reaktion stattfindet, konnte hier auf die Schützung durch Acetylierung des N-Terminus verzichtet werden. Wurde dieses Substrat mit dem als Nukleophil dienenden Pentapeptid GS5_{OH} und GrsB PCP-TE inkubiert, konnte neben dem Hauptprodukt der Hydrolyse auch die Ligation zum Pentadekapeptid beobachtet werden. Auch die Länge des Nukleophils konnte verändert werden. So konnte bei der Reaktion des Heptapeptides GS7_{Ala6-7} (D-Phe –L-Pro –L-Val –L-Orn –L-Leu –L-Ala –L-Ala) mit GS5_{Nac} neben Hydrolyse auch das Ligungsprodukt - ein Dodekapeptid - detektiert werden. Inkubierte man diese beiden neu synthetisierten Substrate zusammen, wurde das bisher längste Ligungsprodukt - ein Heptadekapeptid – gebildet (Abb. 4.9).

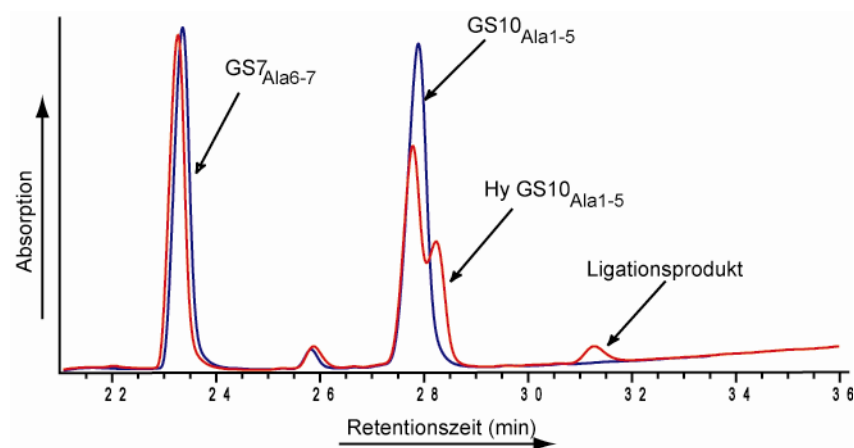


Abbildung 4.9: Ligationsreaktion von GS10_{Ala1-5} (300 μ M) und GS7_{Ala6-7} (400 μ M). In rot ist das UV-Chromatogram der Reaktion mit Enzym und in blau, dass der Reaktion ohne Enzym gezeigt. Hy = Hydrolyse.

Substratmischungen	Reaktionsprodukt	Beobachtete Masse (Kalkulierte Masse)/ [M+H] ⁺
GS5 _{OH} mit GS5 _{Nac}	Hydrolyse	631,4 (631,4)
	Ligationsprodukt	1201,7 (1201,7)
GS10 _{Ala1-5} mit GS5 _{OH}	Hydrolyse	944,7 (944,6)
	Ligationsprodukt	1514,9 (1514,9)
GS7 _{Ala6-7} mit GS5 _{Nac}	Hydrolyse	631,4 (631,4)
	Ligationsprodukt	1343,7 (1343,8)
GS10 _{Ala1-5} mit GS7 _{Ala6-7}	Hydrolyse	944,7 (944,6)
	Ligationsprodukt	829,2 (829,4) [M+2H] ²⁺

Tabelle 4.7: ESI-MS-Daten der Reaktionsprodukte.

4.2 Die Biosynthese des Thiocoralin Chromophors 3-Hydroxychinaldinsäure

Nicht-ribosomale Peptide zeichnen sich gegenüber den ribosomalen Peptiden durch ihre große Mannigfaltigkeit aus. Ein Grund hierfür ist die fast unbegrenzte Anzahl an Bausteinen, die genutzt werden können, um das Grundgerüst der nicht-ribosomalen Peptide aufzubauen. Im Fall des Thiocoralins ist als ein besonderer Baustein das Chromophor 3-Hydroxychinaldinsäure (3HQA) zu nennen. Dieser Baustein ist nicht nur synthetisch interessant, sondern zudem essentiell für die biologischen Eigenschaften von Thiocoralin als DNA-Bisinterkalator. Eine Zielsetzung dieser Arbeit war es, die 3HQA-Biosynthese besser zu verstehen. Im zweiten Teil dieser Arbeit sollen die neu gewonnen Ergebnisse dargestellt werden.

4.2.1 Anzucht von *Micromonospora* L-13-ACM2-092

Der Stamm *Micromonospora* L-13-ACM2-092 wurde von der spanischen Stammsammlung Coleccion Espanola de Cultivos Tipo (CECT-3326) in lyophilisierter Form erhalten und in MS-Medium bei 28°C kultiviert [Baz *et al.*, 2001]. Nach etwa einer Woche konnte die Anzucht des Bakteriums an der orange-roten Farbe verfolgt und nach der Ernte der Zellen die chromosomale DNA präpariert werden.

4.2.2 Klonierung und Expression von *tioI*, *tioG* und *tioF*

Zur Untersuchung der Schlüsselschritte der Biosynthese des Chromophors 3HQA sollten die hierfür postulierten Biosynthesegene amplifiziert und anschließend exprimiert werden. Unter zur Hilfenahme der Sequenz des Thiocoralin-Clusters aus *Micromonospora* sp. ML1 wurden Primer synthetisiert, um die Gene *tioI*, *tioG* und *tioF* mittels PCR zu amplifizieren. Da die Gene *tioF* und *tioG* im Cluster überlappen, wurden beide Gene zusammen amplifiziert und die rekombinanten Proteine später zusammen exprimiert. So wurde *tioG* „in frame“ mit einem N-terminalen His-Tag und *tioF* „in frame“ mit einem C-terminalen His-Tag kloniert. Die Sequenzierung aller DNA-Fragmente zeigte die hohe Ähnlichkeit der Sequenz zu dem bisher beschriebenen Thiocoralin-Cluster (Sequenzen siehe Anhang 1). Die PCR-Fragmente wurden nach entsprechendem Restriktionsverdau in den pET28a-Vektor ligiert (Abschn. 3.1.1.2).

Expression von TioF/ TioG

Beide Proteine konnten zusammen exprimiert und anschließend über Ni-NTA-Chromatographie gereinigt werden. Die Identifikation der Proteine erfolgte über SDS-PAGE Analyse und über massenspektrometrische Fingerprintanalyse eines tryptischen Verdauens (Abb. 4.10).

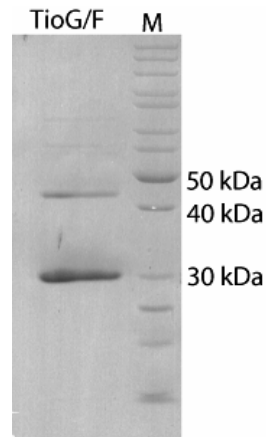


Abbildung 4.10: SDS-PAGE nach der Ni-NTA-Chromatographie von TioG/ TioF.
M = PageRuler™ (Fermentas). Erwartete Proteingrößen: TioG: 47,9 kDa TioF:
27,1 kDa.

Expression und Charakterisierung von TioI

Das Cytochrom P450 Enzym TioI konnte ebenso in löslicher Form exprimiert und anschließend über Ni-NTA-Chromatographie gereinigt werden. Um die Verunreinigungen durch *E. coli* Proteine zu entfernen, wurde hier eine Gelfiltrationschromatographie angeschlossen (Abb. 4.11).

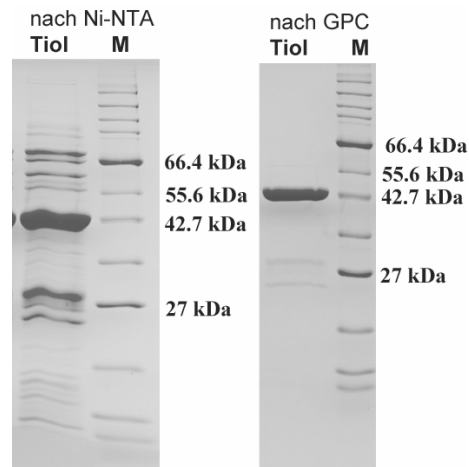


Abbildung 4.11: SDS-PAGE nach der Ni-NTA-Chromatographie und nach der Gelfiltrationschromatographie (GPC). M = Protein Marker Broad Range (NEB).
Erwartete Proteingröße: 46,9 kDa.

Die orange-rote Farbe des Proteins sowie das Absorptionsspektrum mit der Soret-Bande bei 418 nm und zwei kleineren Absorptionen bei 536 und 569 nm zeigte, dass TioI mit dem Häm-Kofaktor beladen ist (Abb. 4.12).

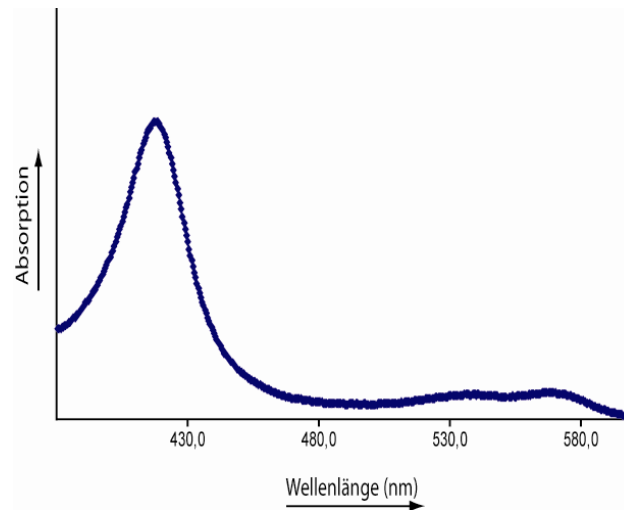


Abbildung 4.12: Absorptionsspektrum von TioI.

Um die Anzahl der an TioI gebundenen Häm-Moleküle zu bestimmen, wurden zwei verschiedene Methoden verwendet. Cytochrom P450 Enzyme weisen in reduzierter Form mit Kohlenstoffmonoxid eine starke Absorption bei 450 nm auf. Zunächst wurde versucht über diesen Komplex die Konzentration an gebundenem Kofaktor zu bestimmen. Hierzu wurde TioI zunächst mit Dithionit reduziert und anschließend Kohlenstoffmonoxid in die TioI-Lösung eingeleitet. Es zeigte sich jedoch, dass dieser Komplex nach nur kurzer Zeit sein Absorptionsmaximum zu 420 nm ändert (Abb. 4.13). Dieses Phänomen wurde schon für wenige weitere Cytochrom P450 Enzyme beschrieben [McLean *et al.*, 2006]. Aus diesem Grund wurde die Kofaktorkonzentration mittels der alkalischen Hämopyridin Methode bestimmt [Omura & Sato, 1964a]. Die Untersuchung verschiedener Expressionsbedingungen, wie Variation der Temperatur, der Induktorkonzentration und Zusätzen von δ -Aminolevulinsäure und FeCl_3 zeigte, dass bei einer Expressionstemperatur von 18°C und Zusätzen von 30 mg/L δ -Aminolevulinsäure und 20 mg/L FeCl_3 ein 1/0,9-1 Verhältnis von TioI zu Kofaktor erreicht wurde. Diese Expressionsbedingungen wurden für alle weiteren Versuche herangezogen.

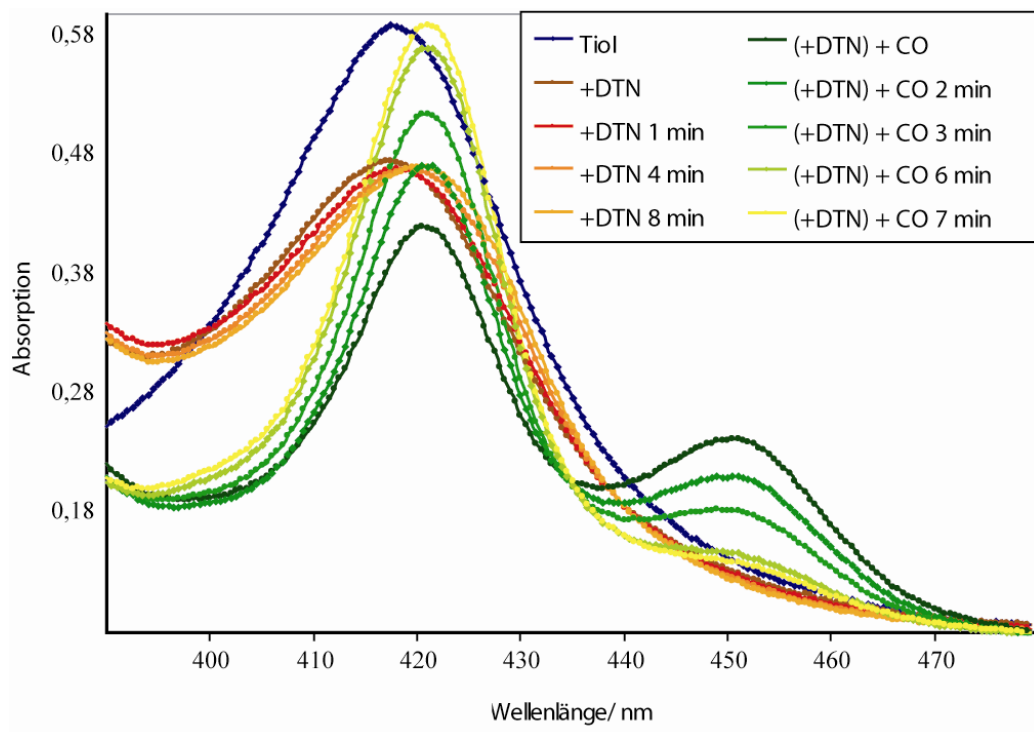


Abbildung 4.13: Absorptionsspektren von TioI vor und nach Zugabe von Dithionit und Begasung mit CO zu verschiedenen Zeitpunkten. DTN = Natriumdithionit

4.2.3 TioF-katalysierter Dioxygenierungsassay

TioF zeigt hohe Homologien zu Tryptophan-2,3-Dioxygenasen. Es wurde daher angenommen, dass es die Öffnung des Indolringes des Tryptophans katalysiert (Abb. 4.14). In *in vitro* Assays wurde TioF zusammen mit Natriumascorbat und Tryptophan inkubiert und der Assay anschließend mittels LC-MS analysiert (Abb. 4.14). Dieses zeigte die postulierte Umsetzung zu N'-Formylkynurenine. Im Jahr 2008 veröffentlichten Sheoran *et al.* (basierend auf der Sequenz von *Micromonospora sp.* ML1) ebenso die TioF-katalysierte Ringöffnung des Tryptophans [Sheoran *et al.*, 2008].

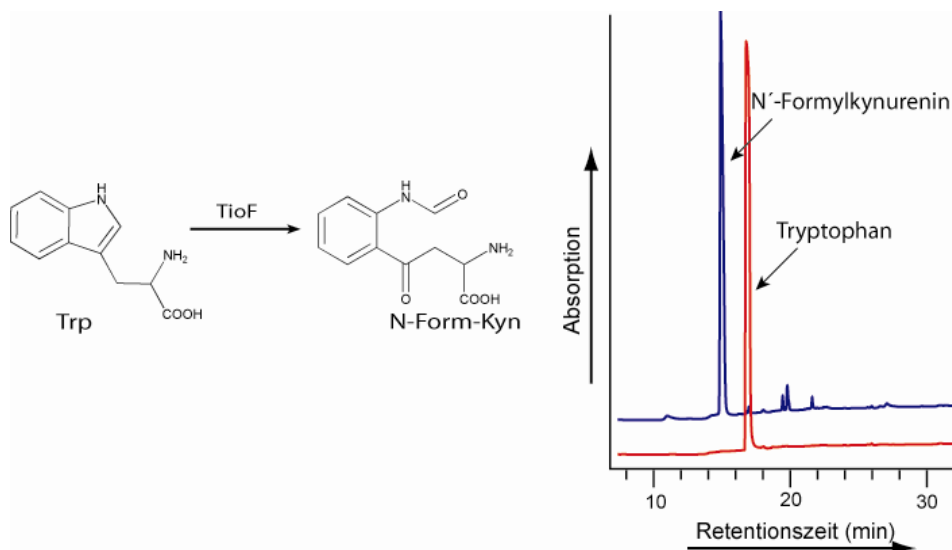


Abbildung 4.14: RP-LCMS Analyse der TioF-katalysierten Umsetzung von Tryptophan zu N'-Formylkynurenin. Das rote UV-Chromatogram zeigt den Assay ohne TioF, das blaue den Assay mit TioF.

Substrat/ Produkt	Kalkulierte Masse $[M+H]^+$	Beobachtete Masse $[M+H]^+$
Tryptophan	205,1	205,2
N'-Formylkynurenin	237,1	237,1

Tabelle 4.8: ESI-MS-Daten der Reaktionsprodukte.

4.2.4 TioG-katalysierter Aminotransferasenassay

TioG zeigt hohe Homologien zu Aspartat/ Kynurenin-Aminotransferasen. Daher wurde angenommen, dass dieses Enzym Kynurenin zur Kynureninsäure umsetzt. Dieses sollte in *in vitro*-Assays bestätigt werden. Aminotransferasen arbeiten mit dem Kofaktor PLP und benötigen neben dem Aminogruppenakzeptor auch einen Aminogruppendonor. Typische Assayzusammensetzungen beinhalteten Pyruvat als Aminogruppenakzeptor, PLP, TioG und Kynurenin als Aminogruppendonor (Abschn. 3.3.7). Anhand der LC-MS-Analyse des Assays konnte eine nahezu vollständige Umsetzung von Kynurenin zur Kynureninsäure gezeigt werden (Abb. 4.15). Dies zeigt erstmalig, dass TioG eine Aminotransferase ist.

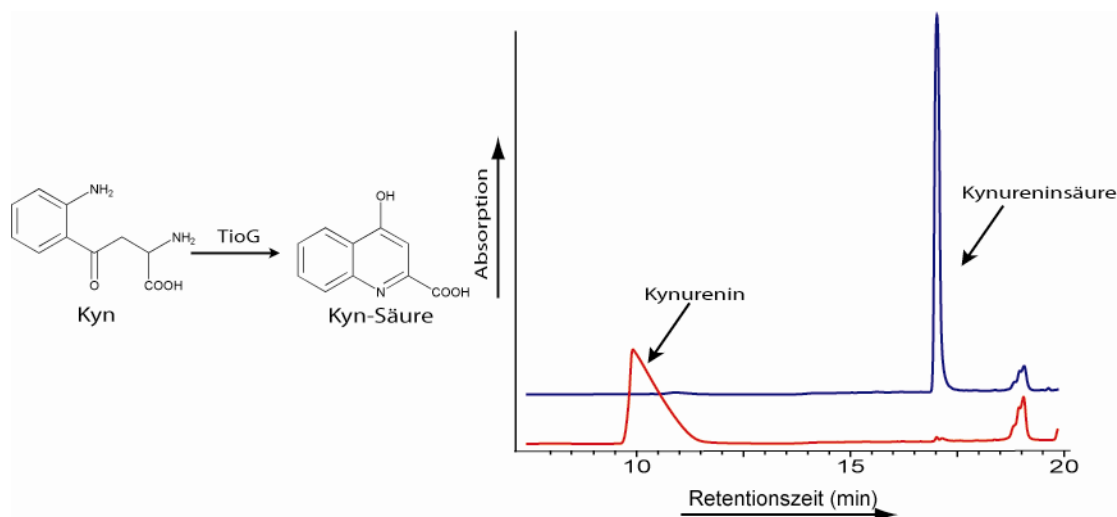


Abbildung 4.15: Umsetzung von 1 mM Kynurenin zur Kynureninsäure katalysiert von TioG (24 h bei 25°C). In rot ist das UV-Chromatogramm des Assays ohne Enzym und in blau mit Enzym dargestellt.

Substrat/ Produkt	Kalkulierte Masse $[M+H]^+$	Beobachtete Masse $[M+H]^+$
Kynurenin	209,1	209,2
Kynureninsäure	190,1	190,1

Tabelle 4.9 : ESI-MS-Daten der Reaktionsprodukte.

4.2.5 Bindungsstudien von TioI mit Chinaldinsäure

Cytochrom P450 Enzyme zeigen mit ihren Substraten oder Inhibitoren konzentrationsabhängige Verschiebungen der charakteristischen Soret-Bande. Diese Verschiebungen können anhand von Differenzspektren, in denen das Enzymspektrum vom Enzym/ Substrat-Spektrum abgezogen wird, ausgewertet werden. Aus der für jede Substratkonzentration spezifischen Absorptionsänderung kann dann mittels einer Michaelis-Menten-artigen Auftragung die Dissoziationskonstante K_d bestimmt werden.

Laut des für die 3HQA Biosynthese postulierten Weges sollte TioI die Chinaldinsäure zu 3HQA oxidieren (Abb. 4.16). Daher wurde an einem Spektrophotometer eine Titrationsstudie von TioI mit der Chinaldinsäure durchgeführt. Hierbei wurden die Absorptionsänderungen in dem Bereich von 380 und 550 nm verfolgt. Als Referenz diente die Titration von Puffer an Stelle der Chinaldinsäure. Die daraus resultierenden Differenzspektren zeigen sehr deutlich, dass bei einer Zugabe von bis zu einer Endkonzentration von 2,4 mM Chinaldinsäure keine charakteristische

Verschiebung der Soret-Bande auftritt (Abb. 4.17). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass TioI ein anderes Substrat als die Chinaldinsäure umsetzt.

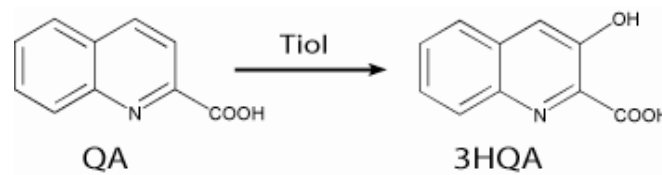


Abbildung 4.16: Postulierte Reaktion des Cytochrom P450 Enzyms TioI. Umsetzung der Chinaldinsäure zur 3-Hydroxychinaldinsäure.

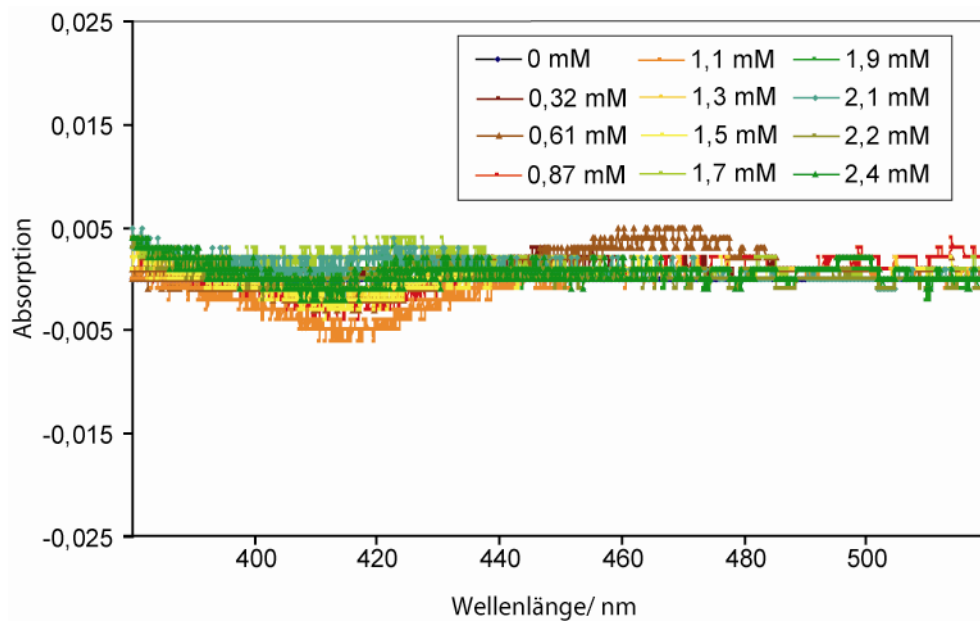


Abbildung 4.17: Differenzspektrum der Titration von QA gegen TioI.

4.2.6 Expression von TioK und der PCP-Domäne aus TioK

Da TioI keine Affinität zu dem postulierten Substrat Chinaldinsäure aufweist, muss die Hydroxylierung in einem anderen Schritt der Biosynthese von 3HQA erfolgen. TioI besitzt Homologien zu Cytochrom P450 Enzymen, die die β -Hydroxylierung von PCP-gebundenen Aminosäuren katalysieren. Beispiele hierfür sind NikQ, welches die β -Hydroxylierung von PCP-gebundenen Histidin katalysiert (55% Ähnlichkeit), NovI, welches die β -Hydroxylierung von PCP-gebundenen Tyrosin katalysiert (59% Ähnlichkeit) und Ecm12, für welches postuliert ist, dass es eine β -Hydroxylierung von PCP-gebundenen Tryptophan katalysiert (81% Ähnlichkeit) [Chen *et al.*, 2002; Chen & Walsh, 2001; Watanabe *et al.*, 2006]. Diese Homologien legen daher nahe, dass TioI ein PCP--gebundenes Substrat umsetzt. Für dieses Reaktion würde eine A-Domäne, zur Aktivierung und Übertragung der Aminosäure auf eine PCP-Domäne benötigt.

Im Thiocoralin-Cluster gibt es einen passenden Kandidat. Die einzelständige bidomänale TioK-NRPS besitzt bisher keine postulierte Funktion im Thiocoralin-Cluster. Diese NRPS, bestehend aus einer A-Domäne und einer PCP-Domäne, könnte daher für diese Reaktion geeignet sein. Der NRPS-Kode dieser A-Domäne (DAWVMTGVGK) entspricht der Aktivierung einer aromatischen Aminosäure, und besitzt hohe Homologien zu Tryptophan-aktivierenden A-Domänen [Rausch *et al.*, 2005]. Diese theoretischen Überlegungen legen daher nahe, dass TioI die β -Hydroxylierung von PCP-gebundenen Tryptophan (Trp-PCP) katalysiert. Um diese Hypothese zu testen, sollte TioK kloniert und exprimiert werden, um die Selektivität der A-Domäne zu bestimmen. Für Bindungsstudien und Aktivitätsassays sollte weiterhin die PCP-Domäne kloniert und exprimiert werden.

Klonierung und Expression von TioK-Konstrukten

Für die Klonierung und Expression von TioK aus *Micromonospora* L-13-ACM2-092 wurde der Expressionsvektor pET28 verwendet. Die Expression von TioK mit N-terminalem His-Tag führte zwar zu einer Expression von TioK, jedoch war dieses nach dem Zellaufschluss im Zellrückstand zu finden. Zur Löslichkeitssteigerung wurde daher *tioK* in verschiedene Vektoren kloniert, die die Expression mit einem Fusionsprotein ermöglichen (pGEX, pBADM30, pETNusa). Des Weiteren wurde *tioK* und die einzelständige Adenylierungs-Domäne in den pET41-Vektor kloniert und anschließend mit C-terminalem His-Tag exprimiert. Nur im Falle einer GST- und einer Nus-Fusion konnten hierbei lösliche Proteine nach der Reinigung erhalten werden (Abb. 4.19). Um auszuschließen, dass das N-terminale Fusionsprotein die Aktivität der A-Domäne beeinflusst, wurde in einem weiteren Experiment der GST-Tag, des aus dem pGEX-Vektors erhaltenen Proteins, mittels Thrombin abgespalten. Die Identifizierung des abgespaltenen TioK erfolgte mittels massenspektrometrische Fingerprintanalyse nach einem tryptischen Verdau. Somit stand auch TioK ohne Fusionsprotein für die Aktivitätstests zur Verfügung.

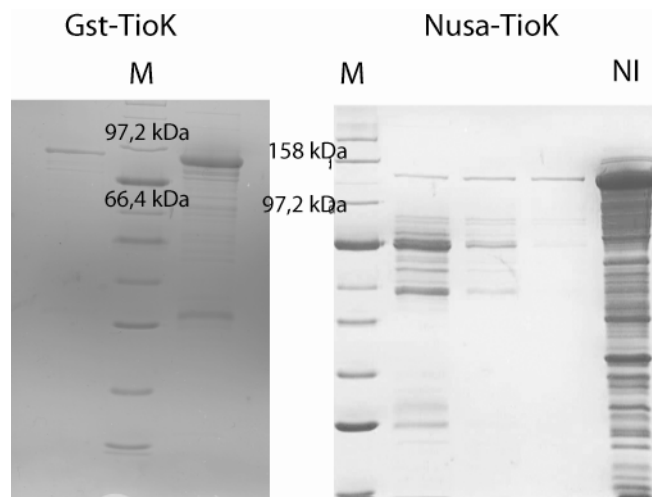


Abbildung 4.19: SDS-PAGE nach der Ni-NTA-Chromatographie von Nusa-TioK und der GST-Affinitätschromatographie von Gst-TioK (pGEX-Vektor). Erwartete Größe: Gst-TioK = 90,3 kDa; Nusa-TioK = 120,5 kDa. M= Protein Marker Broad Range (NEB), NI = Nach der Induktion/ ohne Reinigung.

Adenylierungsdomänen-Aktivitätstest

Die löslichen, gereinigten Proteine Nusa-TioK, Gst-TioK, His-Gst-TioK und TioK wurden in einem ATP/ PPi Aktivitätstest eingesetzt (Abschn. 3.3.5). Als Substrate dienten L-Tryptophan, L-Phenylalanin, N'-Formylkynurenin (Darstellung durch Umsetzung von Trp mit TioF, Abschn. 3.3.9), L-Kynurenin, Chinaldinsäure und Kynureninsäure. Es konnte jedoch mit keinem dieser Substrate eine spezifische Aktivität beobachtet werden.

Klonierung und Expression von PCP aus TioK

Für die Bindungsstudien mit TioI sollte die mit Tryptophan beladene PCP-Domäne aus TioK eingesetzt werden. Die PCP-Domäne wurde aus der chromosomalen DNA amplifiziert und in den pET28a-Vektor ligiert (Abschn. 3.1.1.2). Die Expression erfolgte als His-Tag Fusionsprotein und die anschließende Reinigung mittels Ni-NTA-Chromatographie lieferte das Protein in guten Ausbeuten (6 mg/L Kultur) und einer hohen Reinheit (Abb. 4.20).

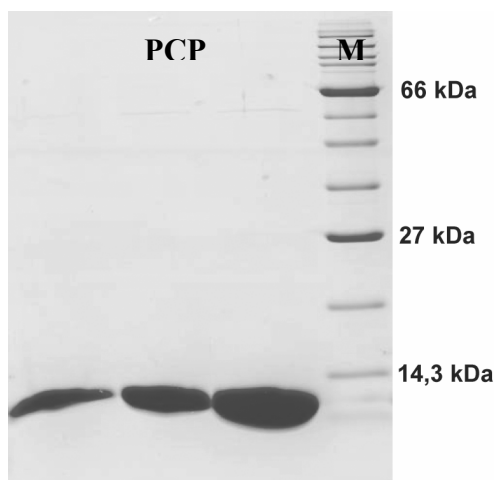


Abbildung 4.20: SDS-PAGE nach der Aufreinigung der PCP-Domäne aus TioK. M = Protein Marker Broad Range (NEB). Erwartete Proteingröße: 11,6 kDa.

4.2.7 Darstellung von PCP-gebundenem Tryptophan

Für die Bindungsstudien von TioI mit beladenem PCP wird dieses in einer hohen Reinheit benötigt. Hierzu wurde zunächst die PCP-Domäne mittels Sfp und Tryptophan-CoA beladen (Abschn. 3.3.6). Anschließend wurde ausgenutzt, dass das beladene PCP einen pI von 8,29 hat, wohingegen Sfp nur einen pI von 5,5 hat. Somit konnte eine schnelle Aufreinigung über einen Anionenaustauscher erfolgen, in der das gewünschte Trp-PCP direkt von der Säule eluierte, während Sfp und anteilig Trp-CoA gebunden blieben. Im Anschluss wurde eine Umpufferung vorgenommen, um auch Restanteile des Trp-CoA zu entfernen. Die Analyse mittels LC-MS zeigte die Reinheit der Probe, sowie dass nur beladenes (Trp-PCP) und kein *apo*- oder unbeladenes *holo*-PCP in der Probe vorhanden waren. Die anschließende Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels des berechneten Extinktionskoeffizienten von Trp-PCP (molarer Extinktionskoeffizient $11,5 \times 10^{-3}$).

Substrat/ Produkt	Kalkulierte Masse	Beobachtete Masse
<i>Apo</i> -PCP	11476 (- Start-Methionin)	-
<i>Holo</i> -PCP	11816 (- Start-Methionin)	-
Trp-PCP	12001 (- Start-Methionin)	12002

Tabelle 4.10: ESI-MS-Daten der Reaktionsprodukte.

4.2.8 Bindungsstudien von TioI mit alternativen Substraten

Um die Affinität von TioI zu Trp-PCP zu untersuchen, wurde Trp-PCP zu einer 2 μM TioI Lösung titriert. Als Referenz diente wiederum die Titration von Puffer zu TioI. Die Differenzspektren der Titration verschiedener Konzentrationen von Trp-PCP zeigten eine deutliche Verschiebung der Soret-Bande von 420 nach 433 nm (Abb. 4.21). Die Michaelis-Menten-artige Auftragung der jeweils maximalen Absorptionsänderung lieferte hierbei einen Wert für die Dissoziationskonstante K_d von $7 \mu\text{M} \pm 2 \mu\text{M}$ (Abb. 4.21). Um auszuschließen, dass es sich hierbei lediglich um Protein-Protein Interaktion handelt, wurde ebenso *apo*-PCP gegen TioI titriert (Abb. 4.22). Hierbei wurde keine Verschiebung der Soret-Bande festgestellt. Des Weiteren wurde als Kontrolle Tryptophan gegen TioI titriert (Abb. 4.23). Auch hier ist bis in den Bereich von 2 mM keine Verschiebung der Soret-Bande zu sehen.

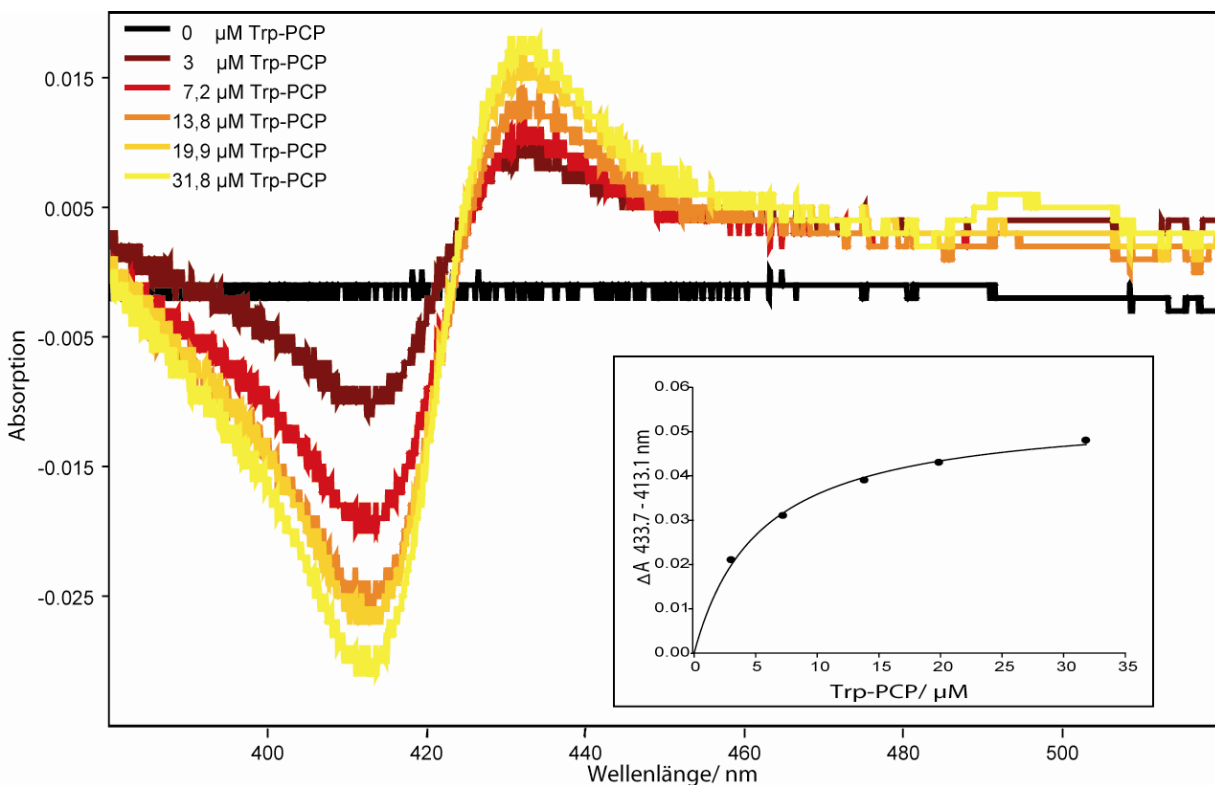


Abbildung 4.21: Differenzspektrum der Titration von Trp-PCP mit TioI. Unten rechts: Michaelis-Menten-artige Auftragung des maximalen Absorptionsunterschieds gegen die Konzentration von TioI.

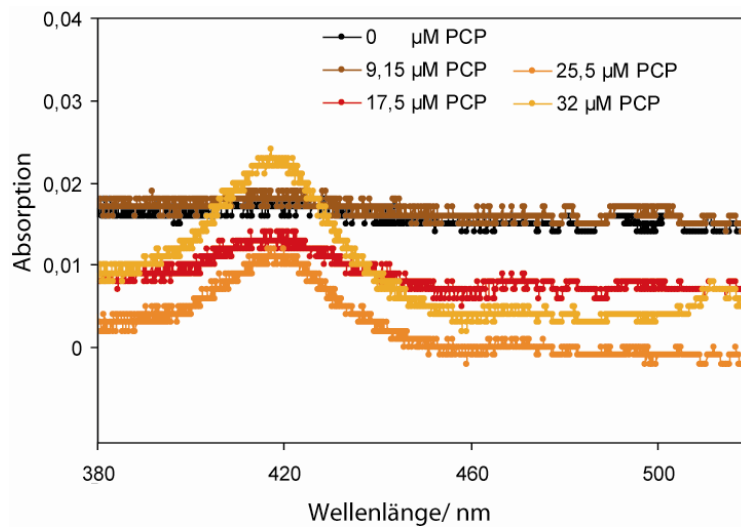


Abbildung 4.22: Differenzspektrum der Titration von PCP mit TioI.

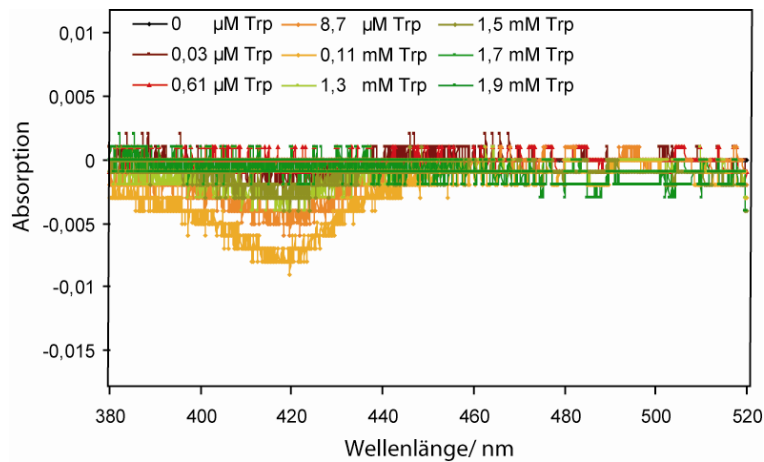


Abbildung 4.23: Differenzspektrum der Titration von Tryptophan mit TioI.

4.2.9 TioI-katalysierter Hydroxylierungsassay

Im folgenden Assay wurde die TioI-katalysierte Hydroxylierung von Trp-PCP analysiert. Für die Elektronenübertragung benötigen viele bakterielle Cytochrome zwei Helferproteine, die Elektronen von NADPH ausgehend übertragen. Da kein Chromosom eines Thiocoralin-Produzenten-Stammes sequenziert ist, wurden hierzu zwei käufliche Proteine aus *Spinacia oleracea* (Spinat) verwendet. So wurde in den Assays Trp-CoA mit Sfp und PCP aus TioK fünf Minuten prä-inkubiert, bevor TioI zusammen mit NADPH, Ferredoxin und der Ferredoxin Reduktase zugegeben wurde. Die Analyse des Hydroxylierungsassays erfolgte nach einer Reaktionsdauer von einer Stunde mittels LC-MS (Abb. 4.24). Hierbei konnte neben der

Hydrolyse von Trp-PCP ein geringer Umsatz zu einem neuen Produkt beobachtet werden, welches in den Kontrollen ohne TioI, Ferredoxin, Ferredoxin Reduktase oder Sfp nicht gebildet wird. Dieses Produkt entsteht demnach durch eine TioI-katalysierte Oxidation von Tryptophan. Die MS/MS-Analyse, sowie ein Retentionszeitenvergleich mit einem käuflichen Standard, konnten dieses Produkt als Indol-3-Carboxaldehyd identifizieren. Weiterhin wurde der Assay bei verschiedenen pH-Werten (7-8) durchgeführt, welches allerdings nicht zu anderen Produkten führte.

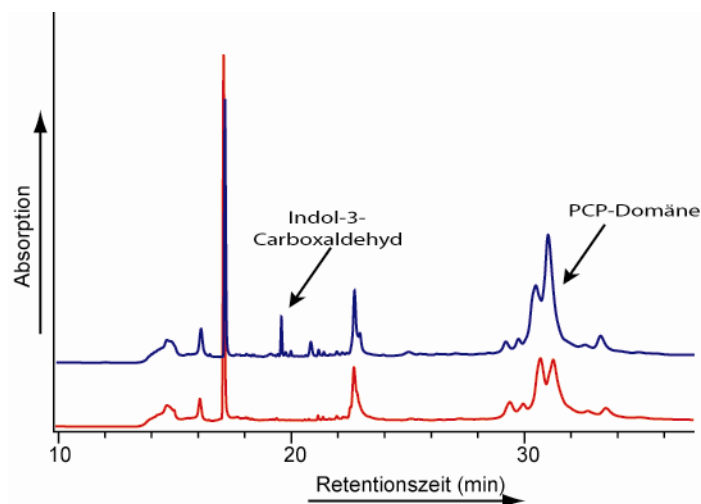


Abbildung 4.24: Umsetzung von Trp-PCP mit TioI. Das rote UV-Chromatogramm entspricht dem Assay ohne Enzym und das blaue dem Assay mit Enzym.

Substrat/ Produkt	Kalkulierte Masse	Beobachtete Masse
<i>Apo</i> -PCP	11476 (- Start-Methionin)	-
<i>Holo</i> -PCP	11816 (- Start-Methionin)	11814
Trp-PCP	12001 (- Start-Methionin)	12002
β -OH-Trp-PCP	12017 (- Start-Methionin)	-
Indol-3-Carboxaldehyd	146,1 [M+H] ⁺	146,1 [M+H] ⁺

Tabelle 4.11: Massenanalyse der Umsetzung Trp-PCP mit TioI, NADPH, Ferredoxin und Ferredoxin Reduktase.

4.2.10 Umsetzung von Indol-3-Carboxaldehyd mit TioF

Da bei der Umsetzung von Trp-PCP das Indol-3-Carboxaldehyd als einziges Produkt gefunden werden konnte, sollte im Folgenden untersucht werden, ob TioF in der Lage ist, dieses Substrat zu oxidieren. Hierzu wurde TioF zusammen mit Tryptophan, Indol-3-Carboxaldehyd und Natriumascorbat über Nacht bei 25°C inkubiert. Die LC-MS-Analyse zeigte, dass nur

Tryptophan umgesetzt wurde (Abb. 4.25). Das Indol-3-Carboxaldehyd wurde nicht umgesetzt und kann daher als Substrat von TioF ausgeschlossen werden.

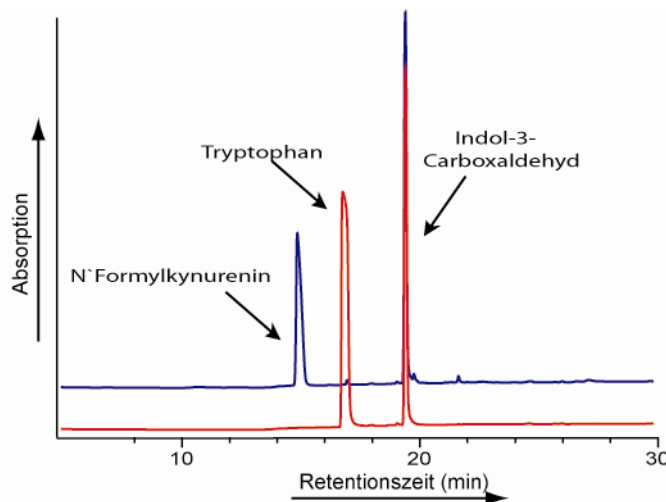


Abbildung 4.25: Umsetzung von Tryptophan in der Gegenwart von Indol-3-Carboxaldehyd. In rot ist das UV-Chromatogramm des Assays ohne TioF und in blau mit TioF dargestellt.

4.2.11 Umsetzung von Trp-PCP mit TioF

Ob TioF auch PCP-gebundene Substrate umsetzen kann, sollte im Folgenden geklärt werden. Hierzu wurde zunächst die PCP-Domäne aus TioK mit Sfp und Trp-CoA inkubiert und anschließend TioF und Natriumascorbat hinzugegeben. Die anschließende massenspektrometrische Analyse zeigte kein PCP-gebundenes N-Formylkynurenin (Tab. 4.12). Weiterhin wurde getestet, ob durch einen gekoppelten Assay zwischen TioI und TioF ein neues Produkt detektiert werden kann. Hierzu wurde der TioI-Assay wie in Abschnitt 4.2.3 beschrieben ausgeführt und TioF, sowie Natriumascorbat hinzugegeben. Auch hier konnte kein zusätzliches Produkt, als wie die in den Einzelreaktionen beschriebenen, beobachtet werden. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass TioF nur freie Substrate akzeptiert.

Substrat/ Produkt	Kalkulierte Masse	Beobachtete Masse
<i>Apo</i> -PCP	11476 (- Start-Methionin)	-
<i>Holo</i> -PCP	11816 (- Start-Methionin)	11816
Trp-PCP	12001 (- Start-Methionin)	12002
N-Form-Kyn-PCP	12013 (- Start-Methionin)	-

Tabelle 4.12: ESI-MS-Daten der Reaktionsprodukte.

5. Diskussion

Iterative NRPS-Produkte bilden eine kleine, dennoch vielfältige Sparte der Sekundärmetaboliten. Aufgrund der unterschiedlichen pharmakologisch relevanten Eigenschaften von Vertretern dieser Klasse gibt es ein stetiges Interesse ihre Biosynthese zu verstehen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zum einen der iterative Mechanismus, der im Wesentlichen durch die TE-Domäne bestimmt wird, untersucht. Weiterhin wurde die Biosynthese des Pharmakophors des Anti-Tumor-Mittels Thiocoralin untersucht.

Im ersten Teil der Diskussion soll die Charakterisierung der iterativen Gramacidin S-Thioesterase erläutert werden. Hier wurde ein chemoenzymatischer Ansatz zum Aufbau neuer zyklischer und linearer Peptide verwendet.

Im zweiten Teil der Diskussion sollen die neuen Erkenntnisse der Biosynthese des Thiocoralin-Chromophors 3-Hydroxychinaldinsäure besprochen werden.

5.1 Charakterisierung der iterativen Gramacidin S-Thioesterase

Die razemisierungsfreie Zyklisierung ist ein limitierender Schritt der organischen Synthese von Naturstoffen. Daher besteht ein stetiges Interesse geeignete Katalysatoren für diese Reaktionen zu finden. Lineare Thioesterasen haben sich in einigen Fällen bewährt, da sie ausschließlich über ein Stereoisomer die Zyklisierung katalysieren [Kopp & Marahiel, 2007; Mahlert, 2007]. In diesen chemoenzymatischen Ansätzen wird die Thioesterase mit synthetischen Peptiden inkubiert.

Zum Anfang der Arbeit stellte sich die Frage in wie fern der iterative Mechanismus für die chemoenzymatische Synthese ausgenutzt werden kann. Hierfür ist es natürlich zunächst erforderlich etwas über den bisher kaum untersuchten iterativen Mechanismus zu lernen. Die Ergebnisse zur Substratspezifität der Gramacidin S-Thioesterase und den iterativen Mechanismus können zudem für ein Engineering der Biosynthese von iterativen NRPS-Systemen zur fermentativen Produktion von neuen Wirkstoffen hilfreich sein.

5.1.1 Gramacidin S-Thioesterase vermittelte Dimerisierung und Zyklisierung

Die iterative Gramacidin S-Thioesterase katalysiert *in vivo* die Dimerisierung zweier Pentapeptide und die anschließende Zyklisierung des entstandenen Dekapeptides. Diese Eigenschaften der Thioesterase sollten zunächst auch *in vitro* mit thioesteraktivierten und auf der natürlichen Sequenz des Gramacidin beruhenden Substraten gezeigt werden. Zu Beginn der Arbeit war

bereits bekannt, dass die Gramicidin-Thioesterase die Zyklisierung eines Dekapeptidyl-SNAC (GS10) katalysiert [Kohli *et al.*, 2001]. Ermutigt durch die auch in dieser Arbeit bestätigte Zyklisierungsaktivität der Thioesterase wurde als nächstes die Dimerisierungsreaktion untersucht. Hierbei konnte die enzymkatalysierte Dimerisierung und Zyklisierung von Thiophenol- oder SNAC-aktivierten Pentapeptiden beobachtet werden. Frühere Studien hatten bisher nur GrsB TE vermittelte geringe Dimerisierung des Pentapeptidyl-SNAC-Substrates beschrieben [Kohli *et al.*, 2001]. Im Gegensatz hierzu konnte im Rahmen dieser Arbeit eine deutliche Bildung des Gramicidin S aus den Pentapeptidylsubstraten detektiert werden. Weiterhin zeigte die kinetische Analyse der Dimerisierungs- und Zyklisierungsreaktion, dass die Umsetzung des SNAC-Pentapeptides zu Gramicidin S langsamer als die Umsetzung des SNAC-Dekapeptides ist. Die Dimerisierungsreaktion scheint daher der geschwindigkeitsbestimmende Schritt zu sein (GS10, $k_{\text{cat}} = 1,3 \text{ min}^{-1}$; GS5_{SNAC}, $k_{\text{cat}} = 0,4 \text{ min}^{-1}$). Dieses war auch zu erwarten, da die Zyklisierungsreaktion eine intramolekulare Reaktion eines vorgefalteten Peptides ist. Im Gegensatz hierzu müssen sich in der zweistufigen Reaktion des Pentapeptides bei der Dimerisierung zunächst zwei Peptide finden.

Allgemein wurde die Eigenschaft von Thioesterasen, eine Dimerisierungsreaktion zu katalysieren, bisher nur wenig untersucht. Zu Beginn dieser Arbeit war bekannt, dass die lineare Tyrocidin-Thioesterase in der Lage ist das native Gramicidin S Pentapeptidyl-SNAC zu dimerisieren und zu zyklisieren [Trauger *et al.*, 2000]. Diese Reaktion von GS5_{SNAC} ist verglichen mit der GrsB PCP-TE vermittelten Reaktion um einiges schneller, jedoch auch mit einer höheren Hydrolyserate verbunden. Da die Tyrocidin-Thioesterase *in vivo* ähnliche Substrate wie die der Gramicidin S-Thioesterase umsetzt, scheint die Sequenzselektivität nicht allein ausschlaggebend hierfür zu sein. Die iterative Thioesterase ist möglicherweise auch durch andere strukturelle Eigenschaften auf die Dimerisierungsreaktion optimiert.

Erst kürzlich wurde die Dimerisierungs- und Zyklisierungsreaktion zweier weiterer iterativer Thioesterasen beschrieben [Koketsu *et al.*, 2008; Robbel *et al.*, 2008]. In diesen Beispielen katalysiert die iterative Echinomycin-Thioesterase eine Laktonisierung und die Thiocoralin-Thioesterase eine Thiolaktonisierung.

5.1.2 Substrattoleranz der Gramicidin S-Thioesterase

Die Substrattoleranz diverser linearer Thioesterasen wurde schon in verschiedenen chemoenzymatischen Ansätzen untersucht [Grunewald *et al.*, 2004; Kohli *et al.*, 2001; Mahler *et*

al., 2005; Tseng *et al.*, 2002]. Weiterhin war zu Beginn dieser Arbeit bekannt, dass die Positionen L-Val₃, L-Orn₄, und D-Phe₆ im Dekapeptid gegen verschiedene Aminosäuren ausgetauscht werden können, ohne dass die GrsB TE-Domänen katalysierte Zyklisierung ausbleibt [Wu *et al.*, 2003]. Daher lag ein Hauptaugenmerk dieser Arbeit darauf, die Substrattoleranz der Oligomerisierungsreaktion zu untersuchen. Hierzu wurde GrsB PCP-TE mit Pentapeptiden inkubiert, bei denen einzelne Aminosäuren gegen Alanin ausgetauscht wurden. In allen Reaktionen konnte weiterhin Dimerisierungs- und Zyklisierungsaktivität nachgewiesen werden. Die Hydrolyserate war jedoch in allen Fällen gegenüber dem nativen Substrat GS5_{SNAC} erhöht. Weiterhin war der Anteil des 15er-Zyklus im Verhältnis zu den anderen Produkten erhöht, was eine geringere Zyklisierungstendenz der korrespondierenden Dekapeptide vermuten lässt (Verhältnis Zehnerzyklus/ 15er-Zyklus: GS5_{SNAC} 6/1, GS5_{Ala2} 5/1, GS5_{Ala3} 2/1). Dieses kann mit den erhöhten K_M -Werten der Zyklisierungsreaktion in Einklang gebracht werden (GS10: K_M , 240 μ M; GS10_{Ala2,7}: K_M , 357 μ M; GS10_{Ala3,8}: K_M 485 μ M).

Die Änderung der Konfiguration am N- oder C-terminalen Ende des Penta- und Dekapeptides führte ausschließlich zu Hydrolyse. Dieses konnte auch für die Zyklisierungsreaktion vieler linearer TE-Domänen festgestellt werden [Kopp & Marahiel, 2007].

5.1.3 Ausschlussprinzipien für die beobachteten Ringgrößen

In den vorangegangenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Gramicidin S-Thioesterase mit Pentapeptiden eine Dimerisierung und Zyklisierung, mit dem Dekapeptid jedoch ausschließlich eine Zyklisierung katalysiert. Es stellte sich demnach die Frage, nach welchen Auswahlprinzipien zwischen einer Oligomerisierung und einer Zyklisierung unterschieden wird. Zur Beantwortung sollte zunächst geklärt werden, wie Substrate verschiedener Länge umgesetzt werden. Es wurde eine Substratbibliothek ausgehend vom Dekapeptidyl-SNAC-Substrat synthetisiert, indem immer eine der mittleren Aminosäuren entfernt wurde. Tabelle 5.1 fasst die gebildeten zyklischen Produkte dieser Substrate zusammen.

	Beobachtete Ringgrößen (enzymkatalysiert)/ Anzahl Aminosäuren										
	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
GS2											
GS3		X									
GS4				X				X			
GS5						X					X
GS6		X						X			
GS7										X	
GS8				X							
GS9					X						
GS10						X					

Tabelle 5.1: Beobachtete Ringgrößen der enzymatischen Umsetzung der Substrate verschiedener Länge. Das Hauptprodukt der Reaktion ist jeweils in rot und das Nebenprodukt in schwarz gekennzeichnet. In grün sind die Ringgrößen mit potentielltem β -Faltblattcharakter gekennzeichnet.

Zum Einen fällt hierbei auf, dass Zyklusgrößen zwischen 6 und 15 Aminosäuren erreicht wurden. Dass keine größeren Ringgrößen beobachtet wurden, zeigt, dass die Größe ein Ausschlusskriterium für die Ringbildung sein könnte. Ob jedoch dieses durch die Größe des aktiven Zentrums beeinflusst wird, lässt sich nur schwer beantworten. So konnte bislang für zwei lineare Thioesterasen die Röntgenkristallstruktur gelöst werden und für eine iterative Thioesterase kürzlich die NMR-Struktur. Im Falle der Surfactin-Thioesterase und der Enterobactin-Thioesterase geht man von einer Lid-Region aus, die sich bei der Zyklisierung schließt und damit vor möglichen Wassereintritt schützt. Bei der Fengycin-Thioesterase hingegen ist ebenso diese Lid-Region vorhanden, jedoch geht man hier von einer eher offeneren Canyon-ähnlichen Struktur aus. Da bei der Ligationsreaktion eines der Substrate noch an der PCP-Domäne gebunden ist, kann hier nur schwerlich eine mehr oder weniger geschlossene katalytische Tasche vorhanden sein. So könnte sich das Kriterium der maximalen Ringgröße eher auf die Zyklisierungsreaktion selber beschränken. Um diese Frage zu beantworten, müsste allerdings die Struktur einer iterativen Thioesterase mit einem Monomer und einem Dimer gebunden gelöst werden.

Ein anderes Kriterium für die beobachteten Ringgrößen könnte jedoch die Struktur bzw. Faltung der linearen Peptide sein. Dass die Vorfaltung der Peptidylsubstrate der Tyrocidin-Thioesterase wichtig für die Effizienz der Zyklisierung ist, konnte bereits gezeigt werden [Trauger *et al.*, 2001]. Ähnlich wie Tyrocidin besitzt Gramicidin S eine β -Faltblattstruktur. Kürzlich berichteten zwei Gruppen, dass das lineare Dekapeptid genauso wie das zyklische Gramicidin S bereits eine antiparallele β -Faltblatt Struktur ausbildet (Abb. 5.1) [Bu *et al.*, 2004; Wadhvani *et al.*, 2006]. Diese Vorfaltung des linearen Substrates sollte die katalytische Effizienz der Zyklisierungsreaktion der Thioesterase steigern.

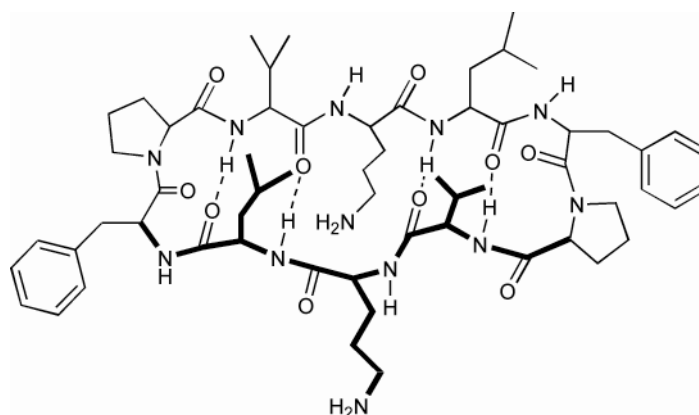


Abbildung 5.1: Antiparallele β -Faltblattstruktur von Gramicidin S.

Dieses Prinzip der Vorfaltung kann auch für die Erklärung der beobachteten Ringgrößen herangezogen werden. Studien zum β -Faltblattcharakter verschiedener Ringgrößen von Gramicidin S Analoga haben gezeigt, dass sich hier die bereits vor etwa 40 Jahren aufgestellte Regel von Schwyzer anwenden lässt. Die Regel besagt, dass alle Ringgrößen mit $2(2n+1)$ Aminosäuren β -Haarnadelstrukturen zeigen [Schwyzer & Ludescher, 1968]. So konnte anhand Gramicidin S Analoga gezeigt werden, dass der sechser, zehner und der 14er-Zyklus eine β -Faltblattstruktur haben, wohingegen die dazwischen liegenden Ringgrößen diese nicht besitzen [Gibbs *et al.*, 1998; Kondejewski *et al.*, 1996]. Somit lässt sich die Sechsring-Bildung als Hauptprodukt des Tripeptides (GS3) und des Hexapeptides (GS6) durch einen erhöhten β -Faltblattcharakter und einer damit erhöhten katalytische Effizienz erklären. Des Weiteren lässt sich dieses auf die Reaktion des Pentapeptides (GS5) zum Zehnerzyklus und die Reaktion des Heptapeptides (GS7) zum 14er-Zyklus anwenden. Bei der Assemblierung des Tetrapeptides ist

keine Bildung eines $2(2n+1)$ Ringes möglich. Hier, wie auch bei den längeren Peptiden (ab Oktapeptid aufwärts) wird wahrscheinlich die Größe der katalytischen Tasche die gebildete Ringgröße beeinflussen. So kann im Fall des Oktapeptides zwar eine geringe Dimerisierung beobachtet werden, die jedoch nur zu einem hydrolysierten Oktapeptid nicht aber zum 16er-Zyklus führt.

Erst kürzlich wurde die Charakterisierung einer zweiten iterativen Thioesterase veröffentlicht [Koketsu *et al.*, 2008]. Die Autoren machten sich gerade diese Eigenschaften der Vorfaltung zunutze, um höhere Umsatzraten zu erreichen und die Hydrolyse als Nebenreaktion der Zyklisierung zu unterdrücken. Die iterative Thioesterase katalysiert die Dimerisierung und die Zyklisierung zum Produkt Triostin A. Triostin A ist ein DNA-Bisinterkalator und weist demnach in der zyklischen Struktur hohe Affinitäten zu definierten DNA-Sequenzen auf. Zugaben von Oligonukleotiden dieser Sequenzen zur Thioesterasen-katalysierten Reaktion konnte die Effizienz der Zyklisierung steigern und die Hydrolyseraten drastisch reduzieren (Zyklisierung/ Hydrolyse ohne Oligonukleotid: 1/2 und mit Oligonukleotid 18/1) [Koketsu *et al.*, 2008].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Reaktion der Thioesterasen zum Einen auf das dazugehörige Substrat optimiert sind, zum Anderen aber auch andere Einflüsse auf die Reaktion einwirken. So spielt die Vorfaltung des Substrates gerade auch bei den iterativen Thioesterasen eine entscheidende Rolle.

5.1.6 Synthetisches Potential der Gramacidin S-Thioesterase

Die in Abschnitt 5.12 beschriebene Substrattoleranz der iterativen Gramacidin S-Thioesterase korreliert im Wesentlichen mit der Selektivität linearer Thioesterasen. So können häufig die mittleren Aminosäuren eines Substrates ausgetauscht werden, wohingegen der N- und der C-Terminus gerade im Hinblick auf die Konfiguration selektiv sind [Grunewald *et al.*, 2004; Kohli *et al.*, 2001; Mahlert *et al.*, 2005; Tseng *et al.*, 2002].

Ein großer Vorteil des iterativen Mechanismus beim Aufbau von Substratbibliotheken liegt in der Möglichkeit Substratgemische für eine Reaktion zu verwenden. So konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass bei Koinkubation des Pentapeptides mit dem Tetrapeptid nicht nur die Zyklen der Einzelreaktionen, sondern auch gemischte Zyklen (4+4+5) gebildet werden. Das gleiche konnte für andere Substratmischungen gezeigt werden. Es kann demzufolge mit nur wenigen Bausteinen (thioesteraktivierte Peptidylsubstrate) eine größere Anzahl an Zyklen

synthetisiert werden. Ein Ausschlusskriterium bleibt hier natürlich die Substratspezifität und wie in Abschnitt 5.1.5 erläutert, scheint die Vorfaltung die katalytische Effizienz zu beeinflussen. Der zweite Punkt muss jedoch nicht als Nachteil gesehen werden, da die Faltung des Endproduktes meist auch entscheidend für die Bioaktivität ist. Das somit also vornehmlich Zyklen mit einer Vorfaltung gebildet werden, kann auch als ein Vorteil gewertet werden.

Da die Zyklisierungsreaktion, obgleich diverser Synthesestrategien für Gramacidin S Analoga, immer noch ein Ausbeuten limitierender Schritt ist, könnte der chemoenzymatische Ansatz auch in Zukunft von Bedeutung sein [Bu *et al.*, 2004].

5.1.7 Die Ligationsreaktion der Gramacidin S-Thioesterase

Das Besondere an iterativen Thioesterasen ist die vorgestellte Oligomerisierungsreaktion. Es stellte sich demnach die Frage, inwiefern das Ligationspotential der Gramacidin S-Thioesterase synthetisch genutzt werden kann. Gleichfalls war es von Interesse die Dimerisierungsreaktion losgelöst von der Zyklisierungsreaktion zu betrachten. Für die Ligationsreaktion wurden Substrate verwendet, bei denen die Zyklisierungsreaktion blockiert wurde. So war der C-Terminus des einen Substrates nicht aktiviert und der N-Terminus des anderen Substrates durch eine Acetylgruppe blockiert worden. Als Produkt dieser Reaktion konnten neben Hydrolyse das Ligationsprodukt, ein Dekapeptid, gefunden werden. Die kinetischen Parameter der Reaktion zeigen, dass das Substrat, welches als Nukleophil dient einen kleineren K_M -Wert besitzt ($GS5_{OH}$ $K_M = 0,62$ mM) als das während der Reaktion an die TE-Domäne gebundene Substrat ($GS5_{Nac}$ $K_M = 1,1$ mM). Allerdings ist die Interpretation dieser Ergebnisse schwierig, da dass an die TE-Domäne gebundene Substrat eine Acetylgruppe am N-Terminus trägt, die eine effektivere Bindung verhindern könnte.

Weiterhin konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Substrate bis hin zu einem 17mer Reaktionsprodukt von der Thioesterase ligiert werden konnten. Die maximale Größe des Ligationsproduktes bleibt jedoch offen. Die synthetische Anwendung der Ligationsreaktion scheint des Weiteren schwierig zu sein, da hohe Hydrolyseraten beobachtet werden. Interessant könnte diese Reaktion werden, wenn sich die Größe des Ligationsproduktes sehr weit nach oben verändern ließe. Dieses müsste durch weitere Experimente geklärt werden.

5.1.8 Mechanismus der iterativen Thioesterase

Erstmals konnten Shaw-Reid *et al.* zeigen, dass die iterative Enterobactin-Thioesterase sowohl eine Ligation als auch eine Zyklisierung katalysiert [Shaw-Reid *et al.*, 1999]. Sie verlangsamten die TE-Domänen katalysierte Reaktion durch Mutationen der katalytischen Triade. Hierdurch konnten sie das TE-gebundene Monomer, sowie auch das TE-gebundene Dimer massenspektrometrisch nachweisen. Sie postulierten für den iterativen Mechanismus, dass das erste Monomer direkt von der PCP-Domäne am C-Terminus der Synthetase auf die TE-Domäne übertragen wird und dort auf das zweite Monomer wartet (siehe Abschn. 1.5). Für die nächsten Reaktionsschritte, die zum TE-gebundenen Dimer führen, gibt es zwei Möglichkeiten. Den sogenannten *Backward* Mechanismus und den *Forward* Mechanismus. Beide sind in Abbildung 5.2 anhand der Reaktion der Gramicidin S-Thioesterase gezeigt.

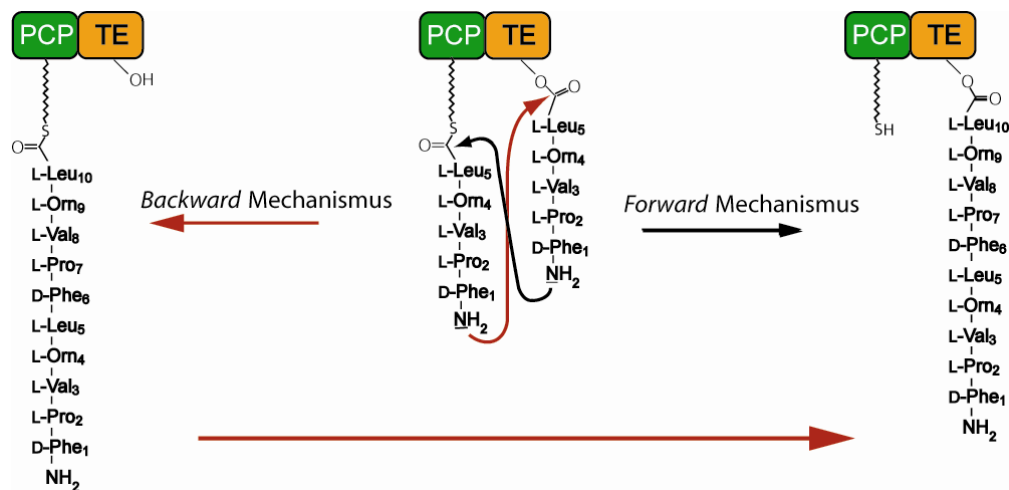


Abbildung 5.2: *Backward* (rote Pfeile) und *Forward* (schwarze Pfeile) Mechanismus. PCP = Peptidyl-Carrier-Protein-Domäne, TE = Thioesterase.

Beim *Backward* Mechanismus greift das PCP-gebundene Monomer (Pentapeptid) nukleophil das TE-Domänen aktivierte zweite Monomer (Pentapeptid) an. Dieses führt zu einem PCP-gebundenen Dekapeptid, welches als nächstes auf die TE-Domäne übertragen wird, um dort zyklisiert zu werden. Beim *Forward* Mechanismus greift das TE-gebundene Monomer des PCP-gebundene Monomer nukleophil an. Diese Reaktion führt direkt zum TE gebundenen Dekapeptid, welches zyklisiert werden kann.

Da die Gramicidin S-Thioesterase eine ungewöhnliche Extension am N-Terminus besitzt, könnte vermutet werden, dass hier eine wichtige katalytische Funktion in Bezug auf die Katalyse des *Forward* Mechanismus sitzt. Ohne diesen Anteil (GrsB TE_{Kurz}) findet jedoch ebenso eine Dimerisierung wie auch eine Zyklisierung statt. Lediglich die Reaktionsgeschwindigkeit wurde stark beeinflusst, was auf eine allgemein geringere Stabilität der TE-Domäne zurückschließen lässt.

Die in dieser Arbeit gezeigten ersten *in vitro*-Untersuchungen einer iterativen Thioesterase lassen vermuten, dass diese Reaktion über den *Backward* Mechanismus abläuft. So konnte bei Reaktionen, denen eine Dimerisierung der Zyklisierung vorausging, das korrespondierende lineare SNAC-aktivierte Dimer gefunden werden. Da SNAC eine Nachahmung des Ppan-Armes der PCP-Domäne ist, würde dieses Intermediat dem PCP-gebundenen Dimer entsprechen. Dieses Intermediat würde nur in der *Backward* Reaktion auftreten. Leider kann nicht endgültig geklärt werden, ob dieses Intermediat nur ein Nebenprodukt der *in vitro*-Reaktion ist. Hiergegen spricht, dass auch im Falle der Echinomycin und der Thiocoralin-Thioesterase in den Dimerisierungsreaktionen mit anschließender Zyklisierung das korrespondierende SNAC-Dimer gebildet wurde [Koketsu *et al.*, 2008; Robbel *et al.*, 2008]. Da folglich in drei Fällen von bisher drei *in vitro* charakterisierten iterativen TE-Domänen dieses Intermediat auftritt, liegt es nahe, dass der *Backward* Mechanismus auch *in vivo* bei den iterativen Thioesterasen erfolgt.

5.2 Analyse der Chromophorbiosynthese des Thiocoralins

Die biologische Aktivität von Thiocoralin beruht neben der rigiden, zyklischen Struktur im Wesentlichen auf der 3-Hydroxychinaldinsäure (3HQA). Diese Gruppe interkaliert mit den DNA-Basen und ist folglich für die Affinität eines Chromodepsipeptides zur DNA entscheidend. Die Beeinflussung der Aktivität durch strukturell verschiedene Chromophore in Chromodepsipeptiden zeigt dieses sehr deutlich [Garcia-Martin *et al.*, 2008]. Die Biosynthese dieser Bausteine der Chromodepsipeptide wurde bisher kaum beschrieben.

Das folgende Kapitel beschäftigt sich mit der Biosynthese des Thiocoralin Chromophors 3HQA. Ausgehend von der postulierten Biosynthese (Abb. 5.3) sollen die neuen Erkenntnisse in Bezug auf eine Änderung des bisher angenommenen Biosyntheseweges und in Bezug zur allgemeinen Chromophorbiosynthese in Chromodepsipeptiden diskutiert werden [Lombo *et al.*, 2006; Watanabe *et al.*, 2006].

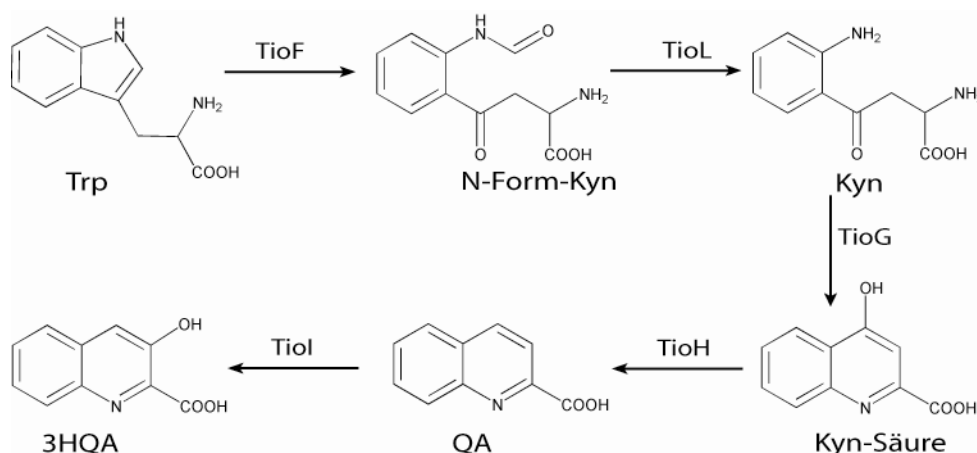


Abbildung 5.3: Bisher angenommener Weg der 3HQA-Biosynthese [Lombo *et al.*, 2006]. Trp = Tryptophan; N-Form-Kyn = N'-Formylkynurenin; Kyn = Kynurenin; Kyn-Säure = Kynurensäure; QA = Chinaldinsäure; 3HQA = 3-Hydroxychinaldinsäure.

5.2.1 Die Tryptophan-2,3-Dioxygenase TioF

Tryptophan-2,3-Dioxygenasen (TDO) und Indolamin-2,3-Dioxygenasen (IDO) katalysieren den ersten Schritt des Tryptophan-Kynurenin Katabolismus, die Umsetzung von Tryptophan zu N'-Formylkynurenin. TDO's konnten bislang in der Leber von Säugetieren, Moskitos und in einigen Bakterien nachgewiesen werden, wohingegen die IDO nur in Säugetieren vorkommt [Batabyal & Yeh, 2007]. Obgleich beide Enzyme Häm-abhängig sind und die gleiche Reaktion katalysieren,

haben sie keine Sequenzhomologien. Des Weiteren ist die TDO eine Tetramer mit einem Häm-Molekül in jedem Monomer während die IDO ein Monomer mit struktureller Ähnlichkeit zum TDO-Monomer ist. Der Mechanismus beider Enzyme ist bis heute nicht vollständig verstanden. Im Allgemeinen wird der Craigee- oder der Dioxetan-Mechanismus für beide Enzyme angenommen (Abb. 5.4). Das auffälligste Merkmal für die Unterscheidung zwischen TDO und IDO ist jedoch die Substratspezifität. So sind TDO's spezifisch für die Umsetzung von L-Tryptophan, wohingegen IDO's eine hohe Substrattoleranz aufweisen [Zhang *et al.*, 2007]. TioF besitzt hohe Sequenzhomologie zu TDO's und katalysiert, wie auch in dieser Arbeit gezeigt (Abschn. 4.2.3), die Umsetzung von L-Tryptophan zu N'-Formylkynurenin. Diese Ergebnisse konnten auch mittels der rekombinanten TDO TioF aus *Micromonospora sp.* ML1 gezeigt werden [Sheoran *et al.*, 2008]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass TioF im Gegensatz zu bisher charakterisierten TDO's eine höhere Substrattoleranz aufweist. So werden neben L-Tryptophan auch D-Tryptophan, Indol und Serotonin umgesetzt [Sheoran *et al.*, 2008]. Interessant ist also die Fragestellung, weshalb TioF sich anders als die homologen TDO's in Bakterien und Eukaryoten verhält, und warum gerade im Thiocoralin-Cluster eine TDO mit einer unerwarteten Substrattoleranz zu finden ist. Es ist daher möglich, dass dieses Enzym auch *in vivo* andere Substrate als L-Tryptophan umsetzt.

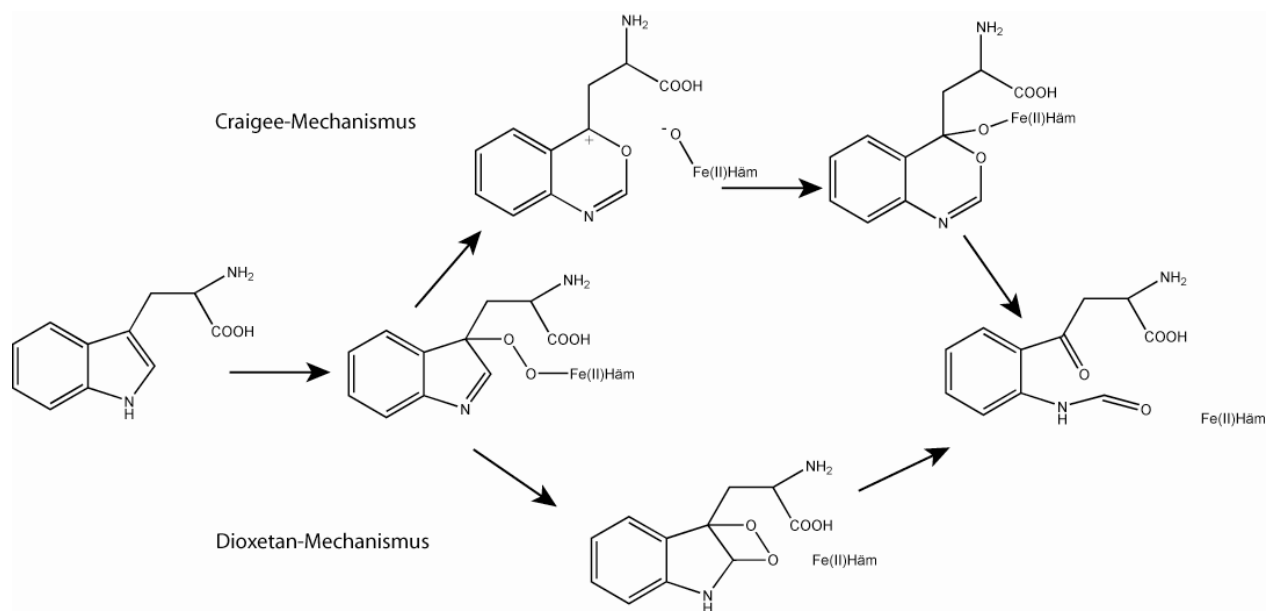


Abbildung 5.4: Mechanismus der Dioxygenierung von Tryptophan. Zwei Wege sind postuliert, der Craigee-Mechanismus und der Dioxetan-Mechanismus. Allen voran geht die Deprotonierung des Indols und die Reaktion mit Sauerstoff [Zhang *et al.*, 2007].

5.2.2 Die Aminotransferase TioG

TioG besitzt hohe Homologien zu Aspartat-Aminotransferasen. Diese Enzyme katalysieren in einer PLP-abhängigen Reaktion die Übertragung einer Aminogruppe von einer Aminosäure auf eine α -Ketosäure. Aspartat-Aminotransferasen gehören zur Subgruppe I der Aminotransferasen und zeigen Substrattoleranz sowohl für den Aminogruppendonor als auch für den Aminogruppenakzeptor [Mehta *et al.*, 1993; Sakuraba *et al.*, 2004]. Typische Aminosäure-Substrate für diese Unterklasse sind L-Phenylalanin, L-Kynurenin, 3-OH-Kynurenin und L-Glutamat [Han *et al.*, 2001; Han & Li, 2004].

In dieser Arbeit wurde die Aminotransferaseaktivität von TioG mit Kynurenin und Pyruvat getestet. Die Umsetzung von Kynurenin zur Kynureninsäure zeigt hierbei deutlich, dass TioG zur Klasse der Aspartat-Aminotransferasen gehört und in der Lage ist, Kynurenin umzusetzen. Somit konnte das erste Mal gezeigt werden, dass TioG eine Aminotransferase ist. Für zukünftige Studien wäre es interessant zu sehen, welche Substrattoleranz TioG besitzt.

5.2.3 Die Monooxygenase TioI

Cytochrom P450 Enzyme (Cyp) sind eine große Klasse von Häm-Proteinen, die unterschiedlichste Reaktionen katalysieren können. Die häufigsten Reaktionen sind C-Hydroxylierungen, Heteroatom-Oxidationen, Heteroatom-Abspaltungen und Epoxidierungen [Isin & Guengerich, 2007]. Allen katalysierten Reaktionen liegt ein Zwei-Elektronen-Übertragungsmechanismus zugrunde (Abb. 5.6).

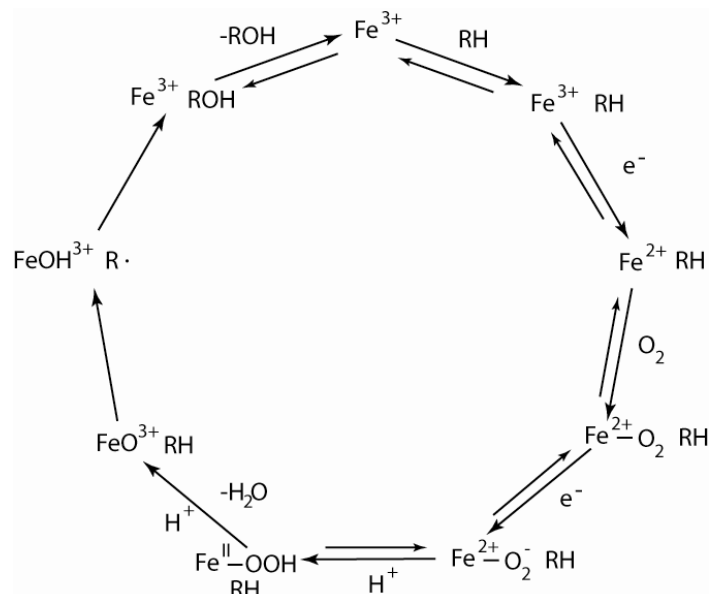


Abbildung 5.6: Katalysemechanismus der Cytochrom P450 Enzyme [Isin & Guengerich, 2008].

5.2.4 Substratspezifität von TioI

Zur Bestimmung der Substratspezifität von TioI wurde ausgenutzt, dass Cytochrome bei einer Substratinteraktion eine konzentrationsabhängige Verschiebung der Soret-Bande aufweisen. Da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass TioI löslich exprimiert und mit 90-100% Kofaktor beladen ist, wurden Substrattitrationsversuche möglich. Zunächst wurde die Affinität der Chinaldinsäure zu TioI untersucht, da es das bisher postulierte Substrat von TioI ist. In den Bindungsstudien konnte gezeigt werden, dass die Chinaldinsäure bis zu einer Konzentration von 2,4 mM keine im Spektrum erkennbare Affinität zu TioI besitzt. Daher wurde nach einem anderen Substrat für TioI gesucht.

TioI besitzt hohe Homologie zu Cytochrom P450 Enzymen (Cyp), die β -Hydroxylierungen an PCP-gebundenen Substraten katalysieren, sowie zu einer Reihe uncharakterisierter Cyp. Die höchste Ähnlichkeit besitzt TioI zu TrsB und Ecm12 (76%, 81% Ähnlichkeit). Für diese Enzyme ist postuliert, dass sie die β -Hydroxylierung von PCP-gebundenem Tryptophan katalysieren [Koketsu *et al.*, 2006]. Des Weiteren gehört TioI zur gleichen Subfamilie wie NikQ, welches die β -Hydroxylierung von Histidin katalysiert, und wie NovI, welches die β -Hydroxylierung von Tyrosin katalysiert [Chen *et al.*, 2002; Chen & Walsh, 2001; Nebert & Gonzalez, 1987]. Ausgehend von diesen Homologien ist es wahrscheinlich, dass auch TioI eine β -Hydroxylierung einer PCP-gebundenen aromatischen Aminosäure katalysiert, und mehr noch aufgrund der hohen Ähnlichkeit zu TrsB und Ecm12 die Hydroxylierung von PCP-gebundenem Tryptophan.

Für die β -Hydroxylierung von PCP-gebundenen Tryptophan müsste also im Thiocoralin-Cluster eine PCP-Domäne, sowie eine A-Domäne zur Beladung der PCP-Domäne vorhanden sein. TioK, ein A-PCP, wäre ein entsprechender Kandidat, welchem bislang keine Funktion zugeschrieben werden konnte. Der NRPS-Kode der A-Domäne (DAWVMTGVGK) entspricht dem unpolarer aromatischer Aminosäuren, wie Tryptophan und Phenylalanin [Rausch *et al.*, 2005]. Weiterhin besitzt er 60% Identität zum NRPS-Kode der Tryptophan-aktivierenden A-Domäne, LtxA, der Synthese von Lyngbiatoxin [Edwards & Gerwick, 2004]. Folglich wurde versucht TioK zu exprimieren und die A-Domänen-Selektivität zu bestimmen. Lösliches Protein konnte hierbei nur durch eine Koexpression mit Fusionsproteinen erhalten werden (Abschn. 4.2.3). Die Konstrukte waren jedoch unter den getesteten Bedingungen im ATP/ PPi-Austausch inaktiv. Um dennoch die Substrataffinität von PCP-gebundenem Tryptophan zu TioI zu charakterisieren, wurde die einzelständige PCP-Domäne der Synthetase TioK heterolog exprimiert. Nach erfolgreicher Beladung der PCP-Domäne mit synthetisiertem Trp-CoA und Sfp wurde eine Aufreinigungsstrategie entwickelt, mit der Trp-PCP erhalten wurde. Dieses wurde direkt für die Bindungsstudien mit TioI eingesetzt. Hierbei konnte eine zu höheren Wellenlängen verschobene Soret-Bande beobachtet werden. Dies entspricht einem Typ II-Spektrum. Eine derartige Verschiebung beruht zumeist auf der Bindung des freien Stickstoffelektronenpaares zum Eisen des Häms. Beobachtet wird dieser Spektrumtyp für Inhibitoren von Cyp und bei Substraten, die ein freies Stickstoffelektronenpaar zur Verfügung haben [Locuson *et al.*, 2007]. Bisher gibt es nur Ansätze den Mechanismus dieser Cyp zu erklären [Narasimhulu, 2007]. Die meisten Cyp bilden mit ihren Substraten ein Typ I-Spektrum. Die Bindungsdissoziationskonstante von Trp-PCP zu TioI beträgt 7 μ M. Sie ist damit in einem Bereich, der schon für ein weiteres PCP-gebundenes Substrat von Cytochromen ermittelt werden konnte. OxyB katalysiert die Vernetzung zweier Aminosäuren im PCP-gebundenen Vancomycin-Vorläufer [Woithe *et al.*, 2007]. Die Bindungskonstante lag hier im Bereich von 17 μ M. Als weitere Substrate für die Bindungsstudien mit TioI wurden auch Tryptophan und *apo*-PCP titriert. In beiden Fällen konnte keine Interaktion mit dem Häm-Kofaktor spektrophotometrisch festgestellt werden. Diese Ergebnisse zeigen sehr deutlich, dass TioI nur PCP-gebundene Aminosäuren als Substrate akzeptiert. Hiermit kann der bisher postulierte Weg für die Biosynthese von 3HQA, mit Chinaldinsäure als Substrat für TioI, ausgeschlossen werden. Die Einführung der Hydroxyfunktion in das Endprodukt findet also entgegen der vorherigen Annahme am Anfang der Chromophorbiosynthese statt.

5.2.5 TioI-katalysierte Umsetzung von Trp-PCP

Cytochrom P450 Enzyme brauchen ein Elektronenzuliefersystem, um ihre Substrate umzusetzen. Da bislang kein Produzentstamm von Thiocoralin vollständig sequenziert ist und im Thiocoralin-Cluster keine Cyp Hilfsenzyme vorhanden sind, wurde auf käufliches Ferredoxin und Ferredoxin Reduktase zurückgegriffen. Inkubierte man dieses System zusammen mit Trp-PCP, TioI und NADPH, konnte als einziges Produkt Indol-3-Carboxaldehyd gefunden werden. Da in den Kontrollen ohne das Elektronenzuliefersystem keine Umsetzung beobachtet wurde, kann Indol-3-Carboxaldehyd nur durch eine Oxidation des Tryptophans entstanden sein (Abb. 5.7). Es findet also, wie vorher postuliert, eine Oxidation an der β -Position des Tryptophans statt, da an dieser Position im Produkt eine neu gebildete Oxo-Funktion gebildet wird. Anders ließe sich das gebildete Produkt nicht erklären. Da TioF, welches den nächsten Reaktionsschritt katalysieren sollte, dieses Indol-3-Carboxaldehyd nicht als Substrat akzeptiert, ist davon auszugehen, dass die Biosynthese *in vivo* nicht über Indol-3-Carboxaldehyd verläuft. Indol-3-Carboxaldehyd ist ein typisches Zerfallsprodukt von β -Hydroxy-aromatischen Aminosäuren. So konnte nach der β -Hydroxylierung von PCP-gebundenem Tyrosin und anschließender basischer Aufreinigung ebenso der korrespondierende 4-OH-Benzaldehyd gefunden werden [Chen & Walsh, 2001]. Das Indol-3-Carboxaldehyd jedoch hier schon direkt im Assay gefunden wird, lässt sich durch die höhere elektronenschiebende Wirkung des Indolrings erklären, was zu einer höheren Instabilität von β -Hydroxytryptophan führen könnte [Crich & Banerjee, 2006]. Obgleich β -Hydroxytryptophan schon in stabiler Form synthetisiert wurde, konnte bislang nicht die Stabilität des korrespondierenden Thioester gezeigt werden [Koketsu *et al.*, 2006]. Dieser könnte aufgrund der größeren Acidität des α -C-Atoms instabiler sein. Aufgrund dieser Betrachtungen ist es möglich, dass Indol-3-Carboxaldehyd ein Zerfallsprodukt von PCP-gebundenem β -Hydroxytryptophan ist. Es konnte allerdings, wahrscheinlich aufgrund des geringen Umsatzes, kein Glycin oder Glycin-PCP als Zerfallsprodukt im Assay nachgewiesen werden. Dieser geringe Umsatz lässt sich neben der Aktivität von TioI durch zwei Ansätze erklären. Zum Einen werden die Elektronen von einem Ferredoxin aus *Spinacia oleracea* und nicht aus dem Ferredoxin des Produzentstammes übertragen, dessen Wechselwirkungen weniger optimal sein könnten. Zum Anderen wurde beschrieben, dass niedrige Umsatzraten bzw. katalytische Effizienzen bei der Bausteinbiosynthese ein häufig angetroffenes Phänomen sind [Samel *et al.*, 2008]. Dieses könnte zur Regulation der Bausteinbiosynthese dienen.

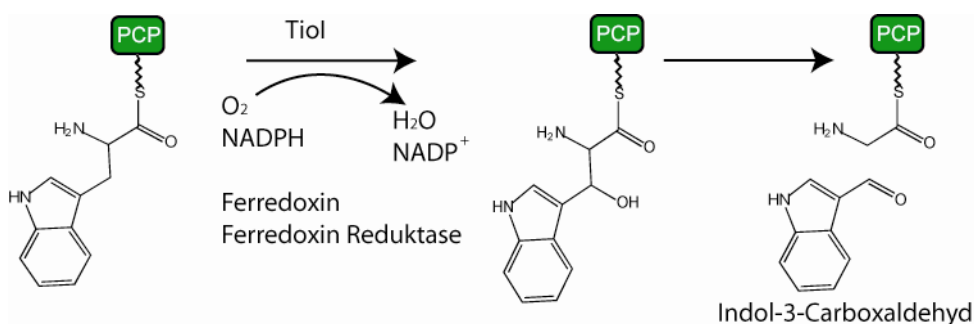


Abbildung 5.7: Umsetzung von Trp-PCP mit TioI. Ansatz zur Erklärung des Produktes Indol-3-Carboxaldehyd.

5.2.6 Neue Erkenntnisse zum Biosyntheseweg der 3-Hydroxychinaldinsäure

Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass die Biosynthese von 3HQA anders abläuft, als bisher postuliert. Es konnte gezeigt werden, dass zum Einen TioG, wie basierend auf Sequenzhomologien vermutet, eine Aminotransferase ist, und das TioI PCP-gebundenes Tryptophan umsetzt. Da TioI weder mit *apo*-PCP noch mit Trp jedoch mit Trp-PCP interagiert, konnte gezeigt werden, dass TioI PCP-gebundene Substrate umsetzt. Da die Substratspezifität der A-Domäne von TioK nicht endgültig geklärt werden konnte, besteht allerdings die Möglichkeit, dass TioI auch andere Aminosäuren an der β -Position hydroxyliert. Da die bisherigen Untersuchungen gezeigt haben, dass die 3HQA-Synthese über Kynurenin und N'-Formylkynurenin verläuft, könnten diese ebenso von der A-Domäne aus TioK aktiviert werden. Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass Trp-PCP definitiv ein Substrat von TioI ist. Vergleicht man den Biosynthesecluster von Echinomycin/ Triostin A mit dem von Thiocoralin, so fällt, die hohe Homologie einiger Gene auf. Diese Gene sind an der Biosynthese des verwandten Chromophors Chinoxalinsäure beteiligt. Für die Chinoxalinsäurebiosynthese wurde postuliert, dass zunächst Tryptophan von einem bidomänen Konstrukt aktiviert und auf die PCP-Domäne beladen wird [Watanabe *et al.*, 2006]. Dieses Enzym Ecm13 besitzt 57% Identität zu TioK und hat weiterhin den gleichen NRPS-Kode. Anschließend wird Tryptophan durch ein Cytochrom P450 Enzym an der β -Position oxidiert. Dieses Cyp hat 69% Identität zu TioI. Das entstandene Produkt β -Hydroxytryptophan wird von der PCP-Domäne freigesetzt und von einer Tryptophan-2,3-Dioxygenase zu β -Hydroxyformylkynurenin umgesetzt. Diese Tryptophan-2,3-Dioxygenase Ecm11 wiederum besitzt hohe Homologien zu TioF (58% Identität). Die weiteren Schritte der Biosynthese beider Chromophore lassen sich nicht durch Enzymhomologa in Verwandtschaft bringen. Es liegt aufgrund der hohen Homologien nahe, dass die Biosynthese von 3HQA in den ersten Schritten ähnlich verläuft wie die von QC. Die Enzyme

des Biosynthesecusters von Echinomycin sind bisher noch nicht charakterisiert worden. Jedoch konnte durch Zufütterungsversuche von deuteriertem (2S,3S)- β -Hydroxytryptophan, dieses als Zwischenstufe der QC-Biosynthese identifiziert werden [Koketsu *et al.*, 2006]. Da in der Echinomycinbiosynthese β -Hydroxytryptophan als Intermediat nachgewiesen wurde, ist dieses auch das wahrscheinlichste Produkt von TioI.

Ausgehend von den bisher erhaltenen Ergebnissen gestaltet sich die Biosynthese von 3HQA folgendermaßen. Zunächst aktiviert die A-Domäne von TioK Tryptophan und überträgt es auf die nebenständige PCP-Domäne. TioI katalysiert die β -Hydroxylierung von PCP-gebundenem Tryptophan. Da gezeigt werden konnte, dass TioF nur freie Substrate akzeptiert, wird β -Hydroxytryptophan als nächstes von einer der beiden Thioesterasen im Cluster freigesetzt. Die anschließende Dioxygenierung mittels TioF führt zu β -Hydroxy-N'-Formylkynurenin. Bis zu diesem Zeitpunkt scheint die Biosynthese von QC und 3HQA gleich abzulaufen (grau unterlegter Teil Abb. 5.8). Die anschließende Deformylierung wird dann wahrscheinlich durch ein Enzym des Primärmetabolismus oder durch TioL/ TioM katalysiert. Als nächstes katalysiert TioG die Reaktion zur Hydroxykynureninsäure und TioH die Reduktion zum Endprodukt 3HQA.

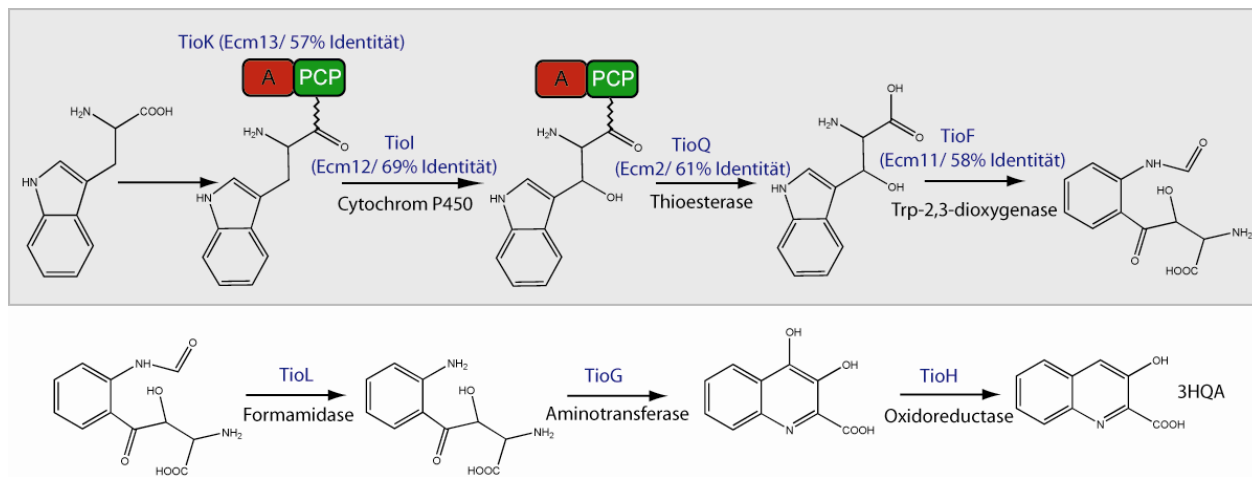


Abbildung 5.8: Biosyntheseweg von 3HQA. In grau unterlegt sind die mit der QC Biosynthese gemeinsamen Schritte.

5.2.7 Ausblick zur Thiocoralin-Biosynthese

Neben der 3-Hydroxychinaldinsäure gibt es weitere strukturell interessante Merkmale des Thiocoralins. So konnte bisher nicht geklärt werden, ob die im Endprodukt vorhandene Disulfidbrücke enzymkatalysiert gebildet wird. Im Echinomycin-System wurde vermutet, dass die Oxidoreduktase Ecm17 diesen Schritt katalysieren könnte. Im Thiocoralin-Cluster gibt es

allerdings kein homologes Enzym. Als weiterer interessanter Baustein ist ein S-methyliertes Cystein in das Peptidgrundgerüst des Thiocoralins eingebaut. Es wurde postuliert, dass die Methylierung durch TioX ein Glyoxylasen-Homologon eingeführt wird [Lombo *et al.*, 2006]. Als weitere Möglichkeit kommt eine einzelständige Adenylierungsdomäne TioN in Betracht. Der NRPS-Kode (DLYDLSLVWK) dieser A-Domäne entspricht Cystein [Rausch *et al.*, 2005]. Interessanterweise ist zwischen Core-Motiv zwei und drei dieser A-Domäne eine SAM-abhängige Methylierungsdomäne eingebaut. Diese könnte die S-Methylierung des Cysteins katalysieren. Als weitere Möglichkeit kommt in Betracht, dass die *in cis* stehende N-Methylierungsdomäne auch eine S-Methylierung katalysiert. Kürzlich wurde der Biosynthesecluster der Kutzneride veröffentlicht [Fujimori *et al.*, 2007]. Hier wird vermutet, dass eine *in cis* eingebettet Methyltransferase für eine O-Methylierung eines Serins verantwortlich ist. Neben der noch ausstehenden vollständigen Aufklärung der Biosynthese der 3-Hydroxychinaldinsäure gibt es in der Thiocoralin-Synthese also weitere interessante Syntheseschritte. Die Aufklärung der vollständigen Thiocoralin-Biosynthese ist weiterhin ein lohnendes Ziel. Zum Einen kann durch das Wissen über die Biosynthese die fermentative Produktion eventuell gesteigert werden, zum Anderen könnten neue Chromodepsipeptide durch Eingreifen auf genetischer Ebene von Produzentenstämmen synthetisiert werden. Hierdurch könnte es möglich sein, eine neue, potente Klasse von Chromodepsipeptiden zu generieren, ohne auf die meist aufwendige organische Synthese zurückgreifen zu müssen.

6. Anhang

6.1 MS/ MS-Sequenzierungen

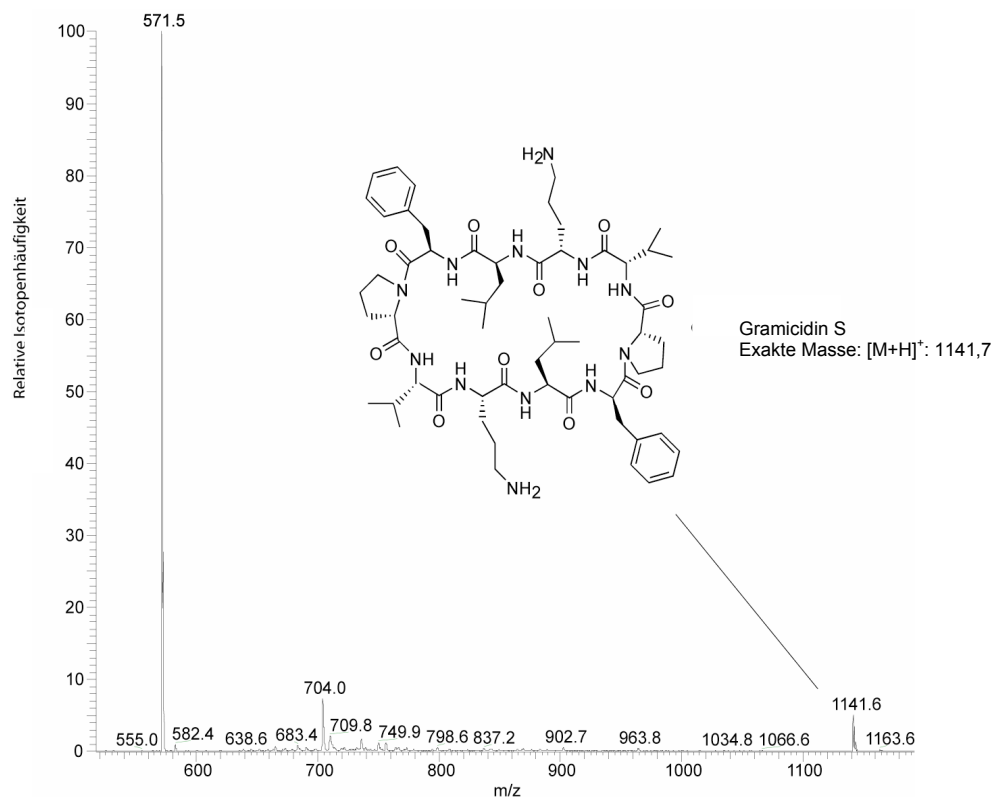
1) MS/ MS-Sequenzierung des zyklisches Produktes (Gramicidin S) der Umsetzung von GS5_{SNAC} (Finnigan LTQ-FT).

Die Beschriftung der einzelnen Fragmente ist in den Spektren angegeben.

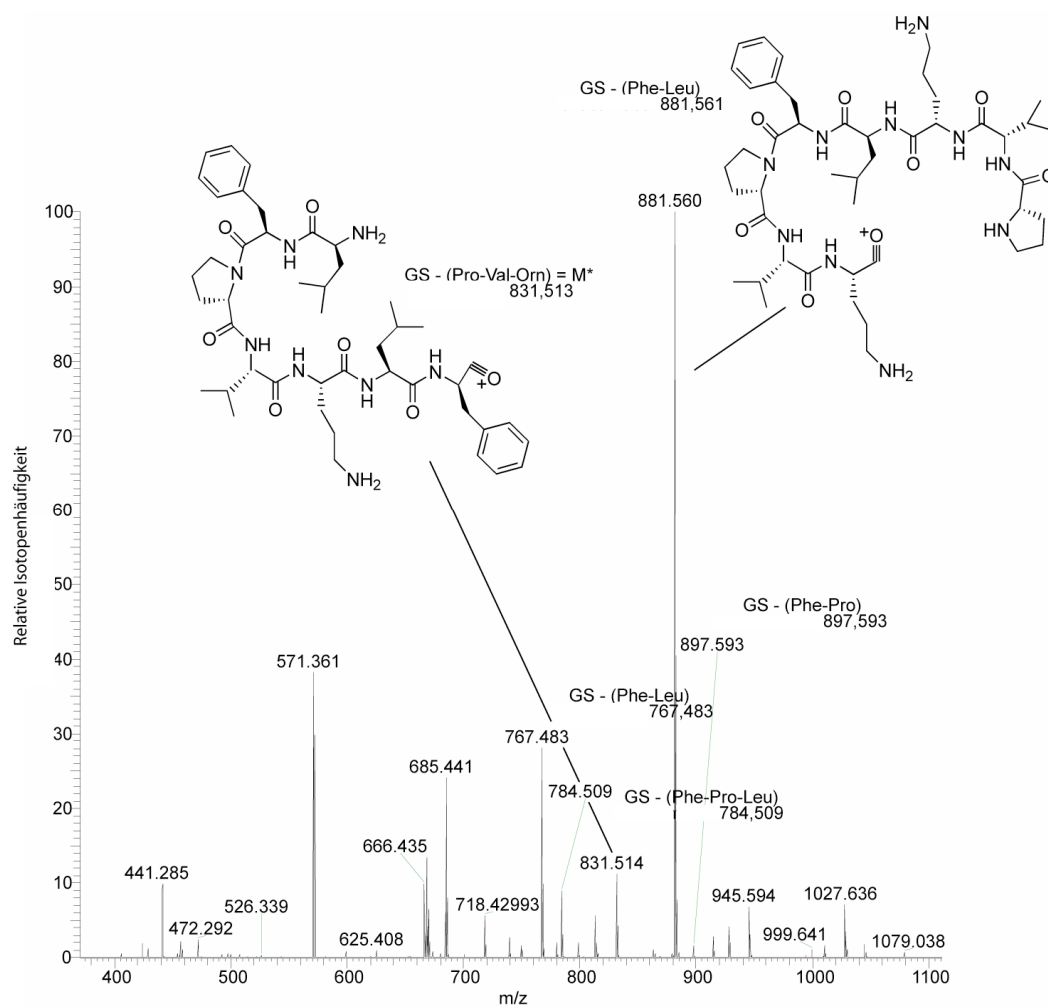
A) Ionenfallen-Massenspektrum B) FT-MS² Spektrum von Gramicidin S (GS).

C) Ionenfallen-MS³ Spektrum von M* (GS - (Pro-Val-Orn); Exakte Masse: 831,513)

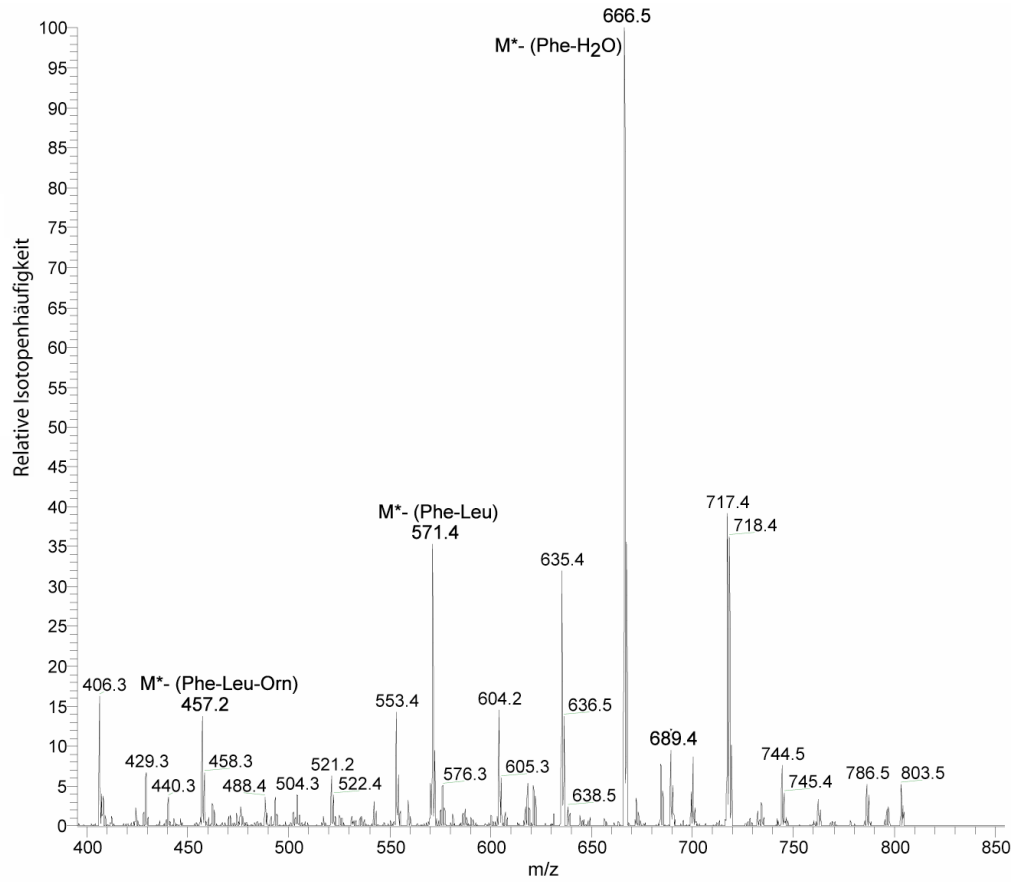
A)



B)



C)

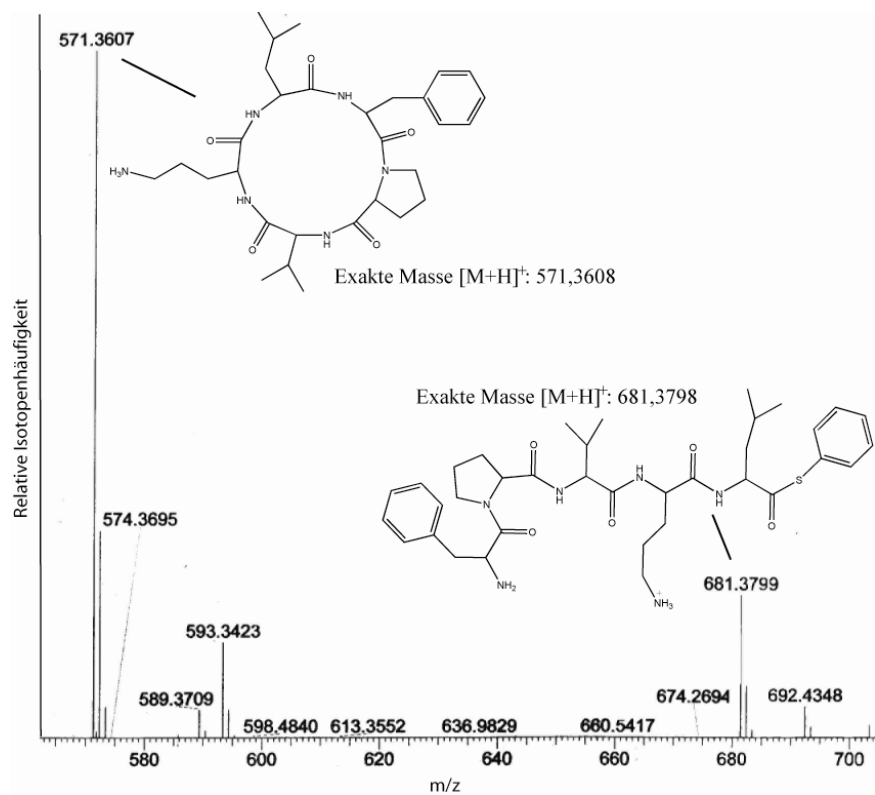


2) MS/ MS-Sequenzierung des Fünferzyklus der Umsetzung von GS5_{SPh} (Finnigan LTQ-FT).

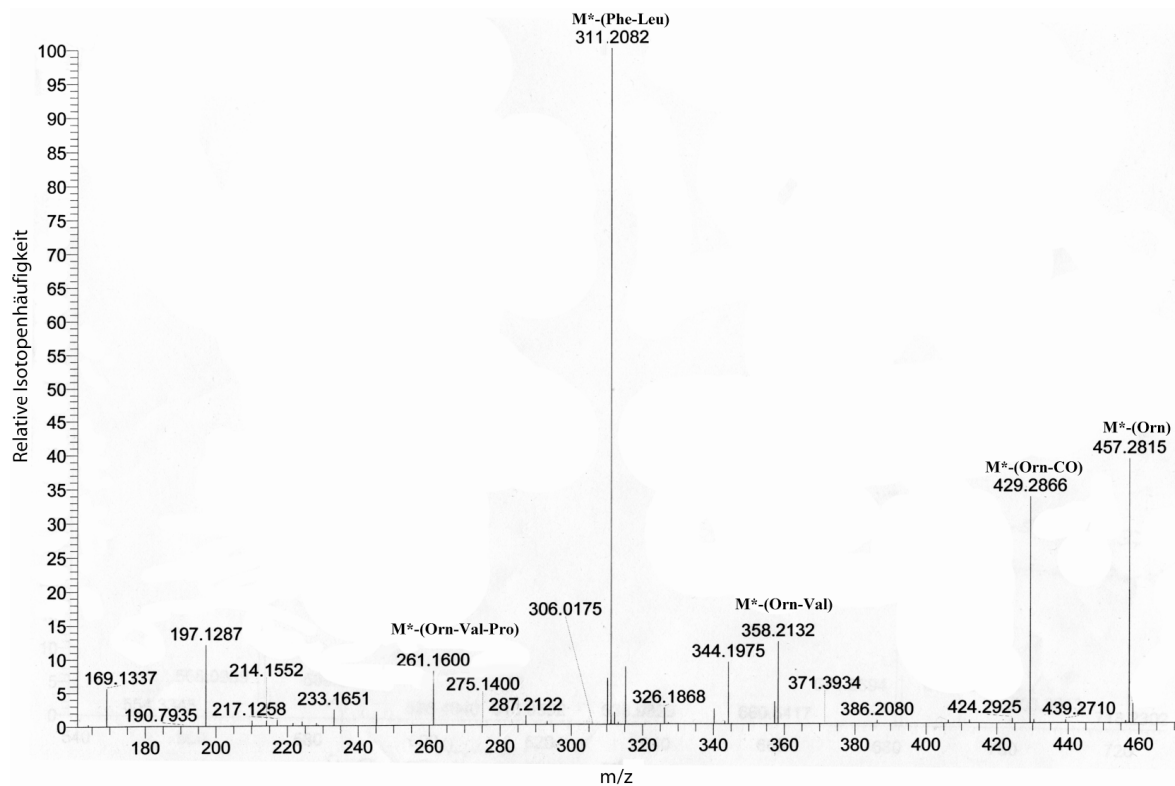
Die Beschriftung der einzelnen Fragmente ist in den Spektren angegeben.

A) Ionenfallen-Massenspektrum B) FT-MS² Spektrum des Fünferzyklus.

A)



B)



6.2 Thiocoralin-Sequenzen

1) Sequenz-Alignment TioI aus *Micromonospora* sp. ML1 und *Micromonospora* L13-ACM2-092

Die Identität beträgt auf DNA-Ebene 94%

1	AACATATGAGTTTCGCCACGGCCAGC	GCCACCGCGCTCGA	PCR TioI Micromonospora L13-ACM2-092
1	AACATATGAGTTTCGCCACGGCCAGC	AGCAGCGCGCTCGA	PCR TioI Micromonospora sp. ML1
41	CCTCGCCGACCCGACGACGTTTCGTGCGCT	ACGACACGCAC	PCR TioI Micromonospora L13-ACM2-092
41	CCTCAACCGACCCGACGACGTTTCGTGCGCT	CACGACACGCAC	PCR TioI Micromonospora sp. ML1
81	GC GTTCTGGGCCGAGGT	ACGTGACCACAACCCC GTCTACT	PCR TioI Micromonospora L13-ACM2-092
81	GT GTTCTGGGCCGAGGT	GCGTGACCACAATCCC GTCTACT	PCR TioI Micromonospora sp. ML1
121	GGTACC	CGGGCCGCGAGGACCGTCCC GGCTTCTGGGTGGT	PCR TioI Micromonospora L13-ACM2-092
121	GGTACC	AGGGCCGCGAGGACCGCCCC GGCTTCTGGGTGGT	PCR TioI Micromonospora sp. ML1
161	CTCGCGATAC	GCGACGTGCTCGCTCTCTACACCGACGC	PCR TioI Micromonospora L13-ACM2-092
161	ATCGCGATAT	GTGACGTGTCTCGCTCTCTACACCGACGC	PCR TioI Micromonospora sp. ML1
201	GCGAG	TTGAGCTCGGCGCGCGGCACCGTGCTGGACGTGC	PCR TioI Micromonospora L13-ACM2-092
201	GCGAG	GTTGAGCTCGGCGCGCGGCACCGTGCTGGACGTGC	PCR TioI Micromonospora sp. ML1
241	TGCT	GCGGGCGAGGACTCCGCTGGCGCGCGAATGCTCGC	PCR TioI Micromonospora L13-ACM2-092
241	TGCT	CGGGCGAGGACTCCGCGCGCGCGCGAATGCTCGC	PCR TioI Micromonospora sp. ML1
281	GGTCAACGAC	CGGCCGCGCCACCGCGAACTACGCAACATC	PCR TioI Micromonospora L13-ACM2-092
281	GGTCAACGAT	CGGCCGCGCCACCGGTGAAGTGGCAACGTC	PCR TioI Micromonospora sp. ML1
321	ATGCT	GCGCGCTTCTCCCCCGGGTGCTCGGACCGGTCTG	PCR TioI Micromonospora L13-ACM2-092
321	ATGCT	CGCGCGTTCTCCCCCGGGTGCTCGGCCGGTCTG	PCR TioI Micromonospora sp. ML1
361	TCGAGCAGGTCCATCG	CGCGCCGACAGCTGATCCGGTCT	PCR TioI Micromonospora L13-ACM2-092
361	TCGAGCAGGTCCATCG	ACGCGCCGACAGCTGATCCGGCTG	PCR TioI Micromonospora sp. ML1
401	GGTCACCGGTACCGGT	TGGGTTTCGACTTCGCCACCGAGGTCT	PCR TioI Micromonospora L13-ACM2-092
401	GGTCACCGGTACCGG	CGCCTTCGACTTCGCCACCGAGGTG	PCR TioI Micromonospora sp. ML1
441	GCCGAGAGCATTCCGATGGGACGATCTGCGACCTGCTGT		PCR TioI Micromonospora L13-ACM2-092
441	GCCGAGAGCATTCCGATGGGACGATCTGCGACCTGCTGT		PCR TioI Micromonospora sp. ML1
481	CGATCCC	GCCAGCGGACCGGCCGGATCTGTTGCGGTGGAA	PCR TioI Micromonospora L13-ACM2-092
481	CGATCCC	ACCGCGGACCGGCCGGATCTGTTGCGGTGGAA	PCR TioI Micromonospora sp. ML1
521	CAAGAACGCCCTCTCTCCGACGAGGCCGACGCC	GACCCG	PCR TioI Micromonospora L13-ACM2-092
521	CAAGAACGCCCTCTCTCTCCGACGAGGCCGACGCC	AACCTG	PCR TioI Micromonospora sp. ML1
561	TACGCCGCGCTGGAGGCCCCGCAACCAGATCCTGCTCTA	CT	PCR TioI Micromonospora L13-ACM2-092
561	TATGCCGCGCTGGAGGCCCCGCAACCAGATCCTGCTCTA	TT	PCR TioI Micromonospora sp. ML1
601	T CATGGA	CTGGCCGAGCAGCGGCGGGCCCGCCCGGGCGA	PCR TioI Micromonospora L13-ACM2-092
601	TCATGGA	TCTGGCCGAGCAGCGGCGGGCCAGTCCCGGGCGA	PCR TioI Micromonospora sp. ML1
641	CGACGTGATCAGCATGATCGCCACTGCC	GCTGTCTCGGCGGC	PCR TioI Micromonospora L13-ACM2-092
641	CGACGTGATCAGCATGATCGCCACTGCC	ACGTCGCGCGGC	PCR TioI Micromonospora sp. ML1
681	GAGCCGCTCTCCATCGACGACGTGCGCTCAACTGCTACA		PCR TioI Micromonospora L13-ACM2-092
681	GAGCCGCTCTCCATCGACGACGTGCGCTCAACTGCTACA		PCR TioI Micromonospora sp. ML1
721	GCCTGATCCTCGGT	GGCGACGAGTCTACGGATGTCGGC	PCR TioI Micromonospora L13-ACM2-092
721	GCTTGATCCTCGG	GGTGACGAGTCTACGGATGTCGGC	PCR TioI Micromonospora sp. ML1
761	GATCTGCGCGGT	AAAGCGTTTCGCGGACTTCCCCGACCAG	PCR TioI Micromonospora L13-ACM2-092
761	GATCTGCGCGGT	CAAGCGTTTCGCGGACTTCCCCGACCAG	PCR TioI Micromonospora sp. ML1
801	TGGCGGGCCGT	GCGGACGGTGACGTGCGATCGACACCG	PCR TioI Micromonospora L13-ACM2-092
801	TGGCGGGCCGT	ACGCGACGGTGACGTGCGATCGACACCG	PCR TioI Micromonospora sp. ML1
841	CGGTTCGAGGAGGTGTTGCGGTGG	GCCACTCCGGCCATGCA	PCR TioI Micromonospora L13-ACM2-092
841	CGGTTCGAGGAGGTGTTGCGGTGG	TCCACGCGGCCATGCA	PCR TioI Micromonospora sp. ML1
881	CTTCGCCCGTACCGCCACCAC	GACTTCGAGCTGCGCGGC	PCR TioI Micromonospora L13-ACM2-092
881	CTTCGCCCGTACCGCCACCAC	GACTTCGAGCTGCGGGC	PCR TioI Micromonospora sp. ML1
921	CAGCAGGTGCGGGC	TGGCGACATCGTGACCCTGTGGAACC	PCR TioI Micromonospora L13-ACM2-092
921	CAGCAGGTGCGGGC	CGGAGACATCGTCAACCTGTGGAACC	PCR TioI Micromonospora sp. ML1

961	TCTCGGCCAACTTCGACGAGCGGGAGTTCGAC	AGGCCCTA	PCR Tiol Micromonospora L13-ACM2-092			
961	TCTCGGCCAACTTCGACGAGCGGGAGTTCGAC	CGGCCCTA	PCR Tiol Micromonospora sp. ML1			
1001	CCGGTTCGAGGTGG	C GCGTACCCCGAACAAAGCAC	G TGTCTG	PCR Tiol Micromonospora L13-ACM2-092		
1001	CCGGTTCGAGGTGG	G GCGTACCCCGAACAAAGCAC	C TGTCTG	PCR Tiol Micromonospora sp. ML1		
1041	TTCGGCCA	C GGCCCGCAC	TTCTGCCTCGG	T GCCTACCTTG	PCR Tiol Micromonospora L13-ACM2-092	
1041	TTCGGCCA	T GGCCCGCAT	TTCTGCCTCGG	C GCCTACCTTG	PCR Tiol Micromonospora sp. ML1	
1081	GCCG	G GCCGAGCTGCAGGCGTTGCTCACCGCG	T TGGTCG	C	PCR Tiol Micromonospora L13-ACM2-092	
1081	GCCG	C GCCGAGCTGCAGGCGTTGCTCACCGCG	C TGGTCG	G	PCR Tiol Micromonospora sp. ML1	
1121	AACCGT	C TCGCGCATCGAGT	A CGCG	G GGGTC	A CCCC GGCGC	PCR Tiol Micromonospora L13-ACM2-092
1121	AACCGT	T TCGCGCATCGAGT	C CGCC	G GGGTC	G CCCC GGCGC	PCR Tiol Micromonospora sp. ML1
1161	GTCTACTCGAACTTCCTCAACGGCCACAGCTCGCTGCCCG				PCR Tiol Micromonospora L13-ACM2-092	
1161	GTCTACTCGAACTTCCTCAACGGCCACAGCTCGCTGCCCG				PCR Tiol Micromonospora sp. ML1	
1201	TCGCCTTCACGGGTCGCTGAGGATCCAA				PCR Tiol Micromonospora L13-ACM2-092	
1201	TCGCCTTCACGGGTCGCTGAGGATCCAA				PCR Tiol Micromonospora sp. ML1	

2) Sequenz-Alignment TioG/ F aus *Micromonospora* sp. ML1 und *Micromonospora* L-13-ACM2-092

Die Identität beträgt auf DNA-Ebene 94%

1	AACATATATGCCCTTGCCAAAGCCCCCTATCCCAA	CTGTGCTCGA	PCR GF micromonospora sp. ML1		
1	AACATATATGCCCTTGCCAAAGCCCCCTATCCCAA	CTGTGCTCGA	PCR TioGF Micromonospora L13-ACM2-092		
41	CGGTCCCCTCGGTTCGATCGACGATTCCGTCTCGTTCGGA	GCTG	PCR GF micromonospora sp. ML1		
41	CGGTGCCGCTGTGTCTCGCTCGACGATTCCGTCTCGTTCGGA	ACTG	PCR TioGF Micromonospora L13-ACM2-092		
81	CATCGCGCTCTTCTCGCGATGCCGGCGAG	CGCGAGCGCG	ATCA	PCR GF micromonospora sp. ML1	
81	CATCGCGGGAAGACGCGATGCCGGACGAG	CGCGAGCGCG	GCCA	PCR TioGF Micromonospora L13-ACM2-092	
121	GCGGTGTGTCTCCGGTGTACCAAGCTGCATGTCTCGGCGAGCCCTA		PCR GF micromonospora sp. ML1		
121	GCGGCGTCTCCGGTGTACCAAGCTGCATGTCTCGGCGAGCCCTA		PCR TioGF Micromonospora L13-ACM2-092		
161	CTTCAACCCCGGCCAACCCGAGGTCGCGCAGGCGCTTGGCG	GAG	PCR GF micromonospora sp. ML1		
161	CTTCAACCCCGGCCAACCCGAGGTCGCGCAGGCGCTTGGCG	CAG	PCR TioGF Micromonospora L13-ACM2-092		
201	GCGGTGTACCGCAGGGGCG	CACCGACTACAC	GCGGTTCGAGG	PCR GF micromonospora sp. ML1	
201	GCGGTGTACCGCAGGGGCG	TACCGACTACAC	C GCGGTTCGAGG	PCR TioGF Micromonospora L13-ACM2-092	
241	GGCTGTCTGGAGCTCCGCGAGCGTCTGTGGTGGAGAAAGCTTCGC		PCR GF micromonospora sp. ML1		
241	GGCTGTCTGGAGCTCCGCGAGCGTCTGTGGTGGAGAAAGCTTCGC		PCR TioGF Micromonospora L13-ACM2-092		
281	TGACCAGAACGGCGTGGGACACCGATGTGTCCCGGCTCTTC		PCR GF micromonospora sp. ML1		
281	CGACGAGAACGGCGTGGGACGCGACGTGTTCCTCGGCTCTTC		PCR TioGF Micromonospora L13-ACM2-092		
321	GTCACCCCGCGCTCCTGTTCAGGGCCTTGGCGCGCTGATGC		PCR GF micromonospora sp. ML1		
321	GTCACCCCGCGCTCCTGTTCAGGGCCTTGGCGCGCTGATGC		PCR TioGF Micromonospora L13-ACM2-092		
361	AGGCGGTGGCCGAACCCG	ACGCGGAGATCCTGTCTGCCGGA	PCR GF micromonospora sp. ML1		
361	AGGCGGTGGCCGAACCCG	GCGCGGAGATCCTGTCTGCCGGA	PCR TioGF Micromonospora L13-ACM2-092		
401	GCTGCACTGGCCCATCCACCT	G CAGCAGG	T GCTGTCTCGCC	PCR GF micromonospora sp. ML1	
401	GCTGCACTGGCCCATCCACCT	C CAGCAGG	C GCTGTCTCGCC	PCR TioGF Micromonospora L13-ACM2-092	
441	GGTCTCCGTCCGGTGTTCCTA	C CCGCTTGGG	ACGCGACTACC	PCR GF micromonospora sp. ML1	
441	GGTCTCTCCGCTCCGGTGTTCCTA	T CCGCTTGGG	G CCGCGACTACC	PCR TioGF Micromonospora L13-ACM2-092	
481	GGACCGGACCCCGAGTCCGGTGTGGCGGCCCTCGACCCGCGAA		PCR GF micromonospora sp. ML1		
481	GGC CGGACCCCGAGTCCGGTGTGGCGGCCCTCGACCCGCGAA		PCR TioGF Micromonospora L13-ACM2-092		
521	CACCAAGATGTGTGTGTG	ATCAACTCACCCGCCAA	C CCGACC	PCR GF micromonospora sp. ML1	
521	CACCAAGATGTGTGTGTG	G TCAACTCACCCGCCAA	T CCGACC	PCR TioGF Micromonospora L13-ACM2-092	
561	GGG GCGCTCCTTCGAC	ACGGCGACCTGAGCACGCT	GATCG	PCR GF micromonospora sp. ML1	
561	GGTG GCGCTCCTTCGAC	C CGGCGACCTGAGCACGCT	CATCG	PCR TioGF Micromonospora L13-ACM2-092	
601	ACATGGCGCGCGCCCG	G GGTGGCAG	GTCATCAGCGACGA	PCR GF micromonospora sp. ML1	
601	ACATGGCGCGCGCGCCCG	T GGTGGCAG	ATCATCAGCGACGA	PCR TioGF Micromonospora L13-ACM2-092	
641	GGCGTACGAGCACTTCTCTTCG	ACGACGAAACAC	G TCTCTG	PCR GF micromonospora sp. ML1	
641	GGCGTACGAGCACTTCTCTTCG	C CGGACGAAACAC	ATCTCTG	PCR TioGF Micromonospora L13-ACM2-092	
681	ACCGCGTCACTGGAGTGGGATGTGCCCGGTCTCCGAGCGGA		PCR GF micromonospora sp. ML1		
681	ACCGCGTTCGCTGGAGCGGAGGTGCCCGGTTCGCGAGCGGA		PCR TioGF Micromonospora L13-ACM2-092		
721	TCTGTGCACAGCTCCTACTCCTTCTCGAAGAGCCTGGCGAT		PCR GF micromonospora sp. ML1		
721	TCTGTGCACAGCTCCTACTCCTTCTCGAAGAGCCTGGCGAT		PCR TioGF Micromonospora L13-ACM2-092		
761	GACCGGCTTACCGATTGGGGGTAC	GTCAGC	ACCGCCAAACGAC	PCR GF micromonospora sp. ML1	
761	GACCGGCTTACCGATTGGGGGTAC	CTCAGCT	GCGCCAAACGAC	PCR TioGF Micromonospora L13-ACM2-092	
801	CGGACCGCGCA	C GCG	TCCGGATCGTGCAGGAGGCCAA	C C	PCR GF micromonospora sp. ML1
801	CGCACCGCGCA	G GCG	TCCGGATCGTGCAGGAGGCCAA	TC	PCR TioGF Micromonospora L13-ACM2-092
841	TTCATTCGCGATGTTCGACCCCGGTGCA	ATACGCGGGGCTGG	A	PCR GF micromonospora sp. ML1	
841	TTCATTCGCGATGTTCGACCCCGGTGCA	GTACGCGGGGCTGG	C	PCR TioGF Micromonospora L13-ACM2-092	
881	GGCGCTGCGGCTGGGACACAGTGGTACG	C GAGAACCG	T GCC	PCR GF micromonospora sp. ML1	
881	GGCGCTGCGGCTGGGACACAGTGGTACG	G GAGAACCG	C GCC	PCR TioGF Micromonospora L13-ACM2-092	

921	ATGGGTGCTCAAGCAAAACCGCGCATGCGGGTGCTGCCCGCGCGGTAC	PCR GF micromonospora sp. ML1
921	ATGGGTGCTCAGCCAAACCGCGCATGCGGGTGCTGCCCGCGCGGTAC	PCR TioGF Micromonospora L13-ACM2-092
961	GCGACGCGCGGCGCTGCTGCCCGAAACTGCCCGCGCGGTGGCTG	PCR GF micromonospora sp. ML1
961	GCGACGCGCGGCGCTGCTGCCCGAAACTGCCCGCGCGGTGGCTG	PCR TioGF Micromonospora L13-ACM2-092
1001	GTACGCA GTGCTCGACGCTCGCGCGACCGGCCTGACCGCC	PCR GF micromonospora sp. ML1
1001	GTACGCG GTGCTCGACGCTCGCGCGACCGGTCTGACCGCGC	PCR TioGF Micromonospora L13-ACM2-092
1041	GAAAGAGTTTCGCCACCGGGCTGCTGGAGACCCGGAAACGTCG	PCR GF micromonospora sp. ML1
1041	GAGAGTTTCGCCGCCGGGCTGCTGGAGAACCCGGAAACGTTGG	PCR TioGF Micromonospora L13-ACM2-092
1081	CGGTGGTTTCCCGGCACCGGGTTTCGGCTTGATGCCCGCGCCT	PCR GF micromonospora sp. ML1
1081	CGGTGGTTTCCCGGCACCGGGTTTCGGCTTGATGCCCGCGCCT	PCR TioGF Micromonospora L13-ACM2-092
1121	GGACGCCCCGGGGCGCGGTTCATCAACCGTCGAAACCGCGCGCC	PCR GF micromonospora sp. ML1
1121	GGACTCCCCGGGGACCGGTTCATCTCGGCGCGAAACCGCGCGCC	PCR TioGF Micromonospora L13-ACM2-092
1161	TGGTTCGCGTCACTCTCA TCCGGATCGCCATGTGCGTA GCGCG	PCR GF micromonospora sp. ML1
1161	TGGTTCGCGCCATCTCTGTCCGGATCGCCATGTGCGTG GCGCG	PCR TioGF Micromonospora L13-ACM2-092
1201	CGTCGGTTGCTGCGCAGCGGCGTACGCGAGAGCTGCTGGAGTT	PCR GF micromonospora sp. ML1
1201	CGTCGGTTGCTGCGCAGCGGCGTACGCGAGAGCTGCTGGAGTT	PCR TioGF Micromonospora L13-ACM2-092
1241	CGCA CGAGAACGCGCCCGGACCGCCGATGACGACCCCTGA	PCR GF micromonospora sp. ML1
1241	CGCGCGAGAACGCGCGGTGGGACCGCCGATGACGACCCCTGA	PCR TioGF Micromonospora L13-ACM2-092
1281	CCTACGCGGACTACCTG CAGGTGACACAGCTGCTGTCCCT	PCR GF micromonospora sp. ML1
1281	CCTACGCGGACTACCTACAGGTGACACAGCTGCTCTCCCT	PCR TioGF Micromonospora L13-ACM2-092
1321	G CAGGA GACCCGCGGCCCGGACACCGCGAGCCGGTTCCTTG	PCR GF micromonospora sp. ML1
1321	A CAGGCGACCCGCGGCCCGGACACCGCGAGCCGGTTCCTTG	PCR TioGF Micromonospora L13-ACM2-092
1361	GTA CTGGCT GAGCACTTCTTTCATCGTCAACCCATCAAGCCT	PCR GF micromonospora sp. ML1
1361	GTA CTGGCTGAGCACTTCTTTCATCA TCAACCCATCAAGCCT	PCR TioGF Micromonospora L13-ACM2-092
1401	GCGAGCTGTGGCTCAAGCAGGTGACGTACGACCTCGACGCG	PCR GF micromonospora sp. ML1
1401	GCGAGCTGTGGCTCAAGCAGGTGACGTTCGACCTGACGCG	PCR TioGF Micromonospora L13-ACM2-092
1441	CGCGGCGGACGCGATGACGCCCGCCCTACGGACCCGAGGAC	PCR GF micromonospora sp. ML1
1441	CGCGGCGGACGCGATGACGCCCGCCCTACGGGCCCGAGGAC	PCR TioGF Micromonospora L13-ACM2-092
1481	GAGGA GCTGGCGCTGGAATTCTCCAGCGGACCCGCTGAGC	PCR GF micromonospora sp. ML1
1481	GAGGA ACTGGCGCTGGAATTCTCCAGCGGACCCGCTGAGC	PCR TioGF Micromonospora L13-ACM2-092
1521	TGCTCCGGGTACTGCAAGAGCAGGTGGTCGCGCTGGAAACG	PCR GF micromonospora sp. ML1
1521	TGCTCCGGGTGCTGCAAGAGCAGGTGGTCGCGCTGGAAACG	PCR TioGF Micromonospora L13-ACM2-092
1561	GTTCGCGCTGCGTCACTTTCGCGGAATTCGCGCCCGTTCTCTC	PCR GF micromonospora sp. ML1
1561	GTTCGCGCTGCGTCACTTTCGCGGAGTTTCGCGCCCGTTCTCTC	PCR TioGF Micromonospora L13-ACM2-092
1601	GACGGGGCGAGCGGTGCGCAGTCGGCGCAGTTTCGCGCCTGC	PCR GF micromonospora sp. ML1
1601	GACGGGGCGAGCGGTGCGCAGTCGGCGCAGTTTCGCGCCTGC	PCR TioGF Micromonospora L13-ACM2-092
1641	TGCGCGCGGCTGCTCGGCGGCGAGCGTCAGGAGGGCGCGCCT	PCR GF micromonospora sp. ML1
1641	TGCGCA CGGCTGCTCGGCGGCGAGCGCTCAGGAGGGCGCGCCT	PCR TioGF Micromonospora L13-ACM2-092
1681	CTACCGGGCCCTTCGAGCGGCTGACCGAGCACAAACGGCACTC	PCR GF micromonospora sp. ML1
1681	CTACCGGGCCCTTCGAGCGGCTGACCGAGCACAAACGGCACTA	PCR TioGF Micromonospora L13-ACM2-092
1721	AGCGTCCGCCGAGGTCTTGCGCA CGGGGCCCGCGCGCGCGCG	PCR GF micromonospora sp. ML1
1721	AGCGTCCGCCGAGGTCTTGCGCGCGGGGCCCGCGCGCGCGCG	PCR TioGF Micromonospora L13-ACM2-092
1761	TGCTCAACCGCATTCGCGCAGACAGCTGCTCGACGTGGCCAA	PCR GF micromonospora sp. ML1
1761	TGCTCAACCGCATTCGCGCAGACAGCTGCTCGACGTGGCCAA	PCR TioGF Micromonospora L13-ACM2-092
1801	CGGCTACTGGCGGTGGAAAGATGACCCACCTTGGCGCTTGGTC	PCR GF micromonospora sp. ML1
1801	CGGCTACTGGCGGTGGAAAGATGACCCACCTTGGCGCTTGGTC	PCR TioGF Micromonospora L13-ACM2-092
1841	TCGAAGATGGTGGGCAATCGCAACGGCACCGGGCGGACGCA	PCR GF micromonospora sp. ML1
1841	TCGAAGATGGTGGGCAATCGCAACGGCACCGGGCGGACGCA	PCR TioGF Micromonospora L13-ACM2-092
1881	CGGGCGTTCGACTATCTTGGGCCCGCGGATCACCCCTTGCCCTT	PCR GF micromonospora sp. ML1
1881	CGGGCGTTCGACTATCTTGGGCCCGCGGATCACCCCTTGCCCTT	PCR TioGF Micromonospora L13-ACM2-092
1921	CGCCCAAGCTGCGGCAAGCTTCGGGGCGCAGGTTCACAGACGCG	PCR GF micromonospora sp. ML1
1921	CGCCCAAGCTGCGGCAAGCTTCGGGGCGCAGGTTCACAGACGCG	PCR TioGF Micromonospora L13-ACM2-092
1961	TTGGTGTGGGAGCAGCGGACTGCGCACACGCAAGCTCGAGA	PCR GF micromonospora sp. ML1
1961	TTGGA TGTGGGAGCAGCGGACTGCGCACACGCAAGCTCGAGA	PCR TioGF Micromonospora L13-ACM2-092
2001	A	PCR GF micromonospora sp. ML1
2001	A	PCR TioGF Micromonospora L13-ACM2-092

3) Sequenz-Alignment TioK aus *Micromonospora* sp. ML1 und *Micromonospora* L-13-ACM2-092

Die Identität beträgt auf DNA-Ebene 93%.

1	AAGAATTTCGTGCCACCGTTGCGGAATTGTTTGAGTCCGT	PCR TioK pGEX <i>Micromonospora</i> sp. ML1
1	AAGAATTTCGTGCCACCGTTGCGGAATTGTTTGAGTCCGT	PCR TioK pGEX <i>Micromonospora</i> L13-ACM2-0
41	TGTTGCGCGCTCGGGCGACCACTGGCGGTGATCTTCGGC	PCR TioK pGEX <i>Micromonospora</i> sp. ML1
41	TGTTGCGCGCTCGGGCGACCACTGGCGGTGATCTTCGGC	PCR TioK pGEX <i>Micromonospora</i> L13-ACM2-0
81	GACCGCTCGTCAGCTATGCCGAACCTCGACGCCGCGCA	PCR TioK pGEX <i>Micromonospora</i> sp. ML1
81	GACCGCTCGTCAGCTATGCCGAACCTCGACGCCGCGCA	PCR TioK pGEX <i>Micromonospora</i> L13-ACM2-0
121	ACCGGTTTGGCGCGGGTGCTGGTTCGAGCGCGGCGTTCGGCC	PCR TioK pGEX <i>Micromonospora</i> sp. ML1
121	ACCGGTTTGGCGCGGGTGCTGGTTCGAGCGCGGCGTTCGGCC	PCR TioK pGEX <i>Micromonospora</i> L13-ACM2-0
161	CGACACCACCGTTGGCGGTGGCCATGCCGAAATGCGACGAG	PCR TioK pGEX <i>Micromonospora</i> sp. ML1
161	CGACACCACCGTTGGCGGTGGCCATGCCGAAATGCGACGAG	PCR TioK pGEX <i>Micromonospora</i> L13-ACM2-0
201	CTGATGGTG GTGCTGCTGGCGGTGCTCAAGGCCGGCGGGC	PCR TioK pGEX <i>Micromonospora</i> sp. ML1
201	CTGATGGTG GTGCTGCTGGCGGTGCTCAAGGCCGGCGGGC	PCR TioK pGEX <i>Micromonospora</i> L13-ACM2-0
241	CCTACCTG CCGCTGGACCCGCAAGTATCCCGCGCAAGCGACT	PCR TioK pGEX <i>Micromonospora</i> sp. ML1
241	CCTACCTG CCGCTGGACCCGCAAGTATCCCGCGCAAGCGACT	PCR TioK pGEX <i>Micromonospora</i> L13-ACM2-0
281	GGCGTACATGGTGCAGGACGCCCGGGCCGACCTGCTGGTC	PCR TioK pGEX <i>Micromonospora</i> sp. ML1
281	GGCGTACATGGTGCAGGACGCCCGGGCCGACCTGCTGGTC	PCR TioK pGEX <i>Micromonospora</i> L13-ACM2-0
321	CGGATG GCGCAGGTGTCGCTGGAACCTCGGGGTGCCGGTTCG	PCR TioK pGEX <i>Micromonospora</i> sp. ML1
321	CGGCTG CCGCAGGTGTCGCTGGAACCTCGGGGTGCCGGTTCG	PCR TioK pGEX <i>Micromonospora</i> L13-ACM2-0
361	CTGAACCTTGTCTGTTGACGACCCCGACACGGCGCGGGAAGAC	PCR TioK pGEX <i>Micromonospora</i> sp. ML1
361	CTGAACCTTGTCTGTTGACGACCCCGACACGGTGC GGGAAGAC	PCR TioK pGEX <i>Micromonospora</i> L13-ACM2-0
401	CGAGTTCGCGGCCAGATCACAGCTGACCGACGCAAGCCGC	PCR TioK pGEX <i>Micromonospora</i> sp. ML1
401	CGCGTTCGCGGCCAGATCACAGCTGACCGACGCAAGCCGC	PCR TioK pGEX <i>Micromonospora</i> L13-ACM2-0
441	AACGCT CCGCTGCGCCCGGACAACCTGATGTACGTCACTCT	PCR TioK pGEX <i>Micromonospora</i> sp. ML1
441	AACGCT CCGCTGCGCCCGGACAACCTGATGTACGTCACTCT	PCR TioK pGEX <i>Micromonospora</i> L13-ACM2-0
481	ACACCTCGGGCTTCGACGGGTACGCCCCAAGGGCGTTCGCCGT	PCR TioK pGEX <i>Micromonospora</i> sp. ML1
481	ACACCTCGGGCTTCGACGGGTACGCCCCAAGGGCGTTCGCCGT	PCR TioK pGEX <i>Micromonospora</i> L13-ACM2-0
521	GACCCACACCGGCGTTCGCCGACATCGTGGCCGCCAGACC	PCR TioK pGEX <i>Micromonospora</i> sp. ML1
521	GACCCACACCGGCGTTCGCCGACATCGTGGCCGCCAGACC	PCR TioK pGEX <i>Micromonospora</i> L13-ACM2-0
561	GCTTCCATCGCGCCCCCGGCCGGGCGACCGGTGCTCTCAGT	PCR TioK pGEX <i>Micromonospora</i> sp. ML1
561	GCTTCCATCGCGCCCCCGGCCGGGCGACCGGTGCTCTCAGT	PCR TioK pGEX <i>Micromonospora</i> L13-ACM2-0
601	GGGCGTTCGGTTCAGCTTCGACGCGGCGTTCTGGGACTGGTC	PCR TioK pGEX <i>Micromonospora</i> sp. ML1
601	GGGCGTTCGGTTCAGCTTCGACGCGGCGTTCTGGGACTGGTC	PCR TioK pGEX <i>Micromonospora</i> L13-ACM2-0
641	GGCGGCGTTGCTGTCCGGTGCCACGCTGATCATGGCCCCG	PCR TioK pGEX <i>Micromonospora</i> sp. ML1
641	GGCGGCGTTGCTGTCCGGTGCCACGCTGATCATGGCCCCG	PCR TioK pGEX <i>Micromonospora</i> L13-ACM2-0
681	GCCGACGAACTGCTGCCGGGCCAACCCTGCGCGACACCC	PCR TioK pGEX <i>Micromonospora</i> sp. ML1
681	GCCGACGAACTGCTGCCGGGCCAACCCTGCGCGACACCC	PCR TioK pGEX <i>Micromonospora</i> L13-ACM2-0
721	TGCGCCGGTACGCGGTACCCACGCGCTGCTGCGCCCGGT	PCR TioK pGEX <i>Micromonospora</i> sp. ML1
721	TGCGCCGGTACGCGGTACCCACGCGCTGCTGCGCCCGGT	PCR TioK pGEX <i>Micromonospora</i> L13-ACM2-0
761	CGCGCTGAGCGTCAACCGACCCGACGATGTGCTCGTCCGGC	PCR TioK pGEX <i>Micromonospora</i> sp. ML1
761	CGCGCTGAGCGTCAACCGACCCGACGATGTGCTCGTCCGGC	PCR TioK pGEX <i>Micromonospora</i> L13-ACM2-0
801	GGCACGCTGATGTGACCGGCGATGCGTGCACCCGCGCGAC	PCR TioK pGEX <i>Micromonospora</i> sp. ML1
801	GGCACGCTGATGTGACCGGCGATGCGTGCACCCGCGCGAC	PCR TioK pGEX <i>Micromonospora</i> L13-ACM2-0
841	TGGTGGCC AAGTGGGCGCCGGGCGCGCGCATGTACAACGG	PCR TioK pGEX <i>Micromonospora</i> sp. ML1
841	TGGTGGCC AAGTGGGCGCCGGGCGCGCGCATGTACAACGG	PCR TioK pGEX <i>Micromonospora</i> L13-ACM2-0
881	CTACGGGCCGACCGAGACCAAGGTCGGTTCGACATCGCC	PCR TioK pGEX <i>Micromonospora</i> sp. ML1
881	CTACGGGCCGACCGAGACCAAGGTCGGTTCGACATCGCC	PCR TioK pGEX <i>Micromonospora</i> L13-ACM2-0
921	GGGCCCATCGCCA TCTCCGACGAGATCACCATCGGTACGC	PCR TioK pGEX <i>Micromonospora</i> sp. ML1
921	GGGCCCATCGCCA TCTCCGACGAGATCACCATCGGTACGC	PCR TioK pGEX <i>Micromonospora</i> L13-ACM2-0

961 C G T G G T C G G G C A A C A G G G T G T A C G T C C T C G A C G A G C G C T C T PCR TioK pGEX Micromonospora sp. ML1
961 C G T G G T C G G G C A A C A G C G T G T A C G T C C T C G A C G A G C G T C T PCR TioK pGEX Micromonospora L13-ACM2-0

1001 G C G C C C G G T T C C G A A C G G C C G C G A C G G C G A G C T G T A C C T G PCR TioK pGEX Micromonospora sp. ML1
1001 G C G T C C G G T A C C G A C G G C C G C G A C G G C G A G T T G T A C C T G PCR TioK pGEX Micromonospora L13-ACM2-0

1041 G C C G G C A A C G G C C T A G C C C G C G G C T A C C T G A A C C G G C C G G PCR TioK pGEX Micromonospora sp. ML1
1041 G C C G G C A A C G G C C T G G C C C G T G G T T A C C T G A A C C G G C C G G PCR TioK pGEX Micromonospora L13-ACM2-0

1081 G C C T G A C G G C G A G C C G G T T C G T G C T C G A C C C C T T C G G C C C PCR TioK pGEX Micromonospora sp. ML1
1081 G G C T G A G C G C C A A C C G G T T C G T G C C C A A C C C C T T C G G C C C PCR TioK pGEX Micromonospora L13-ACM2-0

1121 A C C C G G C G G C C G A T G T A C C G C T C C G G C G A C C G G G G C C A C PCR TioK pGEX Micromonospora sp. ML1
1121 A C C G G G C A G C C G C A T G T A C C G C T C C G G C G A C C G G G G C C A C PCR TioK pGEX Micromonospora L13-ACM2-0

1161 C G C C G C G C G G G A C G G G C A G T T G G T C T T C G C C A G C C G C G G C G PCR TioK pGEX Micromonospora sp. ML1
1161 C G C C G C G C G G G A C A C T T G G T C T T C G C C A G C C G C G G C G PCR TioK pGEX Micromonospora L13-ACM2-0

1201 A C G A C C A G G T G A A G A T C C G T G G C T T C C G C G T C G A G C T C G G PCR TioK pGEX Micromonospora sp. ML1
1201 A C G A C C A G G T G A A G A T C C G T G G T T T C C G C G T C G A G C T C G G PCR TioK pGEX Micromonospora L13-ACM2-0

1241 C G A G G T C G A G G C G C G G C T G G C G C C A C C C T G C G G T G G A T PCR TioK pGEX Micromonospora sp. ML1
1241 C G A G G T C G A G G C A C G G C T G G T G G C G T A C C C G A C G G T G G A T PCR TioK pGEX Micromonospora L13-ACM2-0

1281 G T C G C C G C C G T G G T C G T G G T C G G C G A C C T C G C G G G C G C C C PCR TioK pGEX Micromonospora sp. ML1
1281 G T C G C C G C C G T G G T G G T G G T C G G C G A C C T T G C G G G C G C C C PCR TioK pGEX Micromonospora L13-ACM2-0

1321 G C C T G G C C G C C T T C G T C A G C A C C G T G G C C G G C A C C G G G T PCR TioK pGEX Micromonospora sp. ML1
1321 G C C T G G C C G C C T T C G T C A G C A C C G T G G C C G G C G C C G G G T PCR TioK pGEX Micromonospora L13-ACM2-0

1361 T T C G G C T G C C G A A C T G A G C G C A C A C T C G G C G G A G A C C C T G PCR TioK pGEX Micromonospora sp. ML1
1361 A T C G G C T G C C G A A C T G A G C G C A C A C G C G G C G G A G A C C C T G PCR TioK pGEX Micromonospora L13-ACM2-0

1401 C C G G A A C A C A T G G T G C C G T C A T C G G T G C A G G T G T T A C A G C PCR TioK pGEX Micromonospora sp. ML1
1401 C C G G A A C A C A T G G T G C C G T C A T C G G T G C A G G T G T T G C C G C PCR TioK pGEX Micromonospora L13-ACM2-0

1441 G G C T C C C G G T C A C C G C C A A C G G C A A G A T C G A C C G G G C G G C PCR TioK pGEX Micromonospora sp. ML1
1441 A A C T T C C G G T C A C C G C C A A C G G C A A G A T C G A C C G T G C G G C PCR TioK pGEX Micromonospora L13-ACM2-0

1481 G T T G C G G A C C T C G C C G A G T C G G C G G C G C A C C C C G A C G C A PCR TioK pGEX Micromonospora sp. ML1
1481 G T T G C G C G A G C T G G C C G A G T C G G C G G C G C A C C C C G A C G C A PCR TioK pGEX Micromonospora L13-ACM2-0

1521 G C A G C C T C G G C C G G T C C T C C C G G C G A G G A T C C G A C C T C G G PCR TioK pGEX Micromonospora sp. ML1
1521 G C G G C C C G G C C G A T G C T T C C G G C G A C G A T C C G A C C T C T G PCR TioK pGEX Micromonospora L13-ACM2-0

1561 T G G A G A G C C G G C T A T G T C T G C T G G T C A G G G A G C T T C T G G C PCR TioK pGEX Micromonospora sp. ML1
1561 T G G A G A G C C G G C T G T G C T G C T G G T C A G G G A G C T T C T G G C PCR TioK pGEX Micromonospora L13-ACM2-0

1601 G G T G C C G G A C G T C A G G C C G G G C G A C A A C T T C T T C A A A C T G PCR TioK pGEX Micromonospora sp. ML1
1601 G G T G C C G G A C G T C A G G C C G G G C G A C A A C T T C T T C A A A C T G PCR TioK pGEX Micromonospora L13-ACM2-0

1641 G G C G G C C A C T C G G T G C T G G C G A C C C G G C T C G C C G G A C G G C PCR TioK pGEX Micromonospora sp. ML1
1641 G G C G G C C A C T C G G T G C T G G C G A C C C G G C T C G C C G G A C G G C PCR TioK pGEX Micromonospora L13-ACM2-0

1681 T C C G C G A C G A G T G G G G A A T C A C C G T G C C G A T C C G G G C G G T PCR TioK pGEX Micromonospora sp. ML1
1681 T C C G C G A C G A G T G G G G A G T C A C C G T G C C G A T G C G G G C G G T PCR TioK pGEX Micromonospora L13-ACM2-0

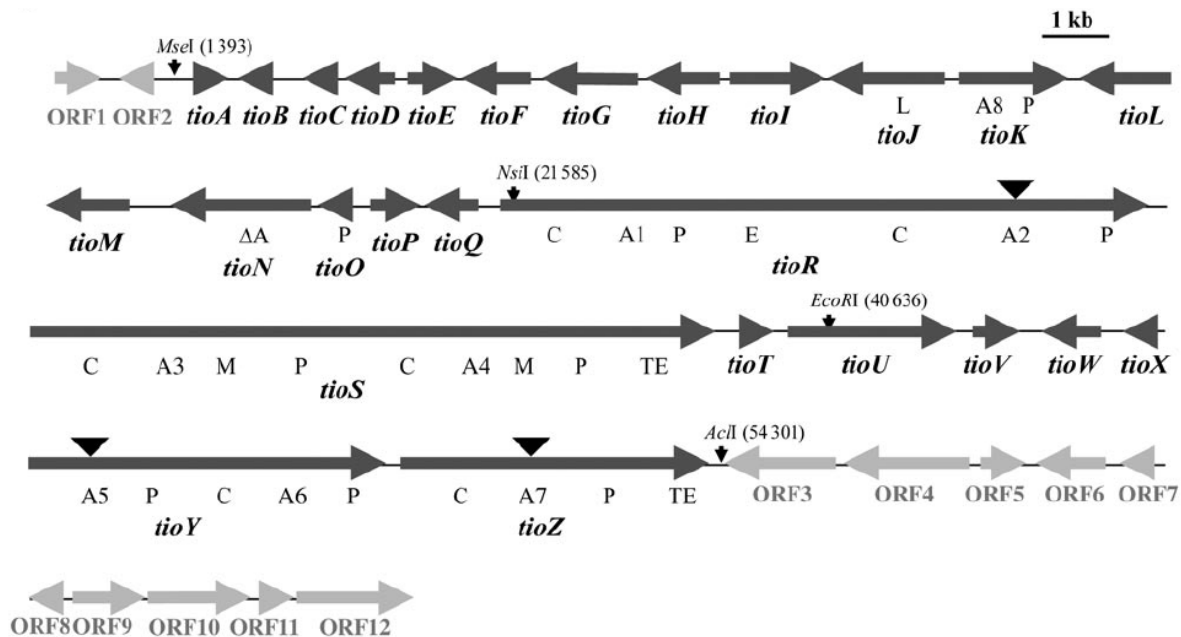
1721 G T T C G A G G C G G C C A C C C T G T C C G A G C T C G C C T G G T C G T G PCR TioK pGEX Micromonospora sp. ML1
1721 C T T C G A G G C G G A G A C C C T G G C C G A G C T T G C C T C G G C C G T G PCR TioK pGEX Micromonospora L13-ACM2-0

1761 C A G G C G T C G A A G G C A T C C A T C C C C A A C G G G C G C C C G C G G C PCR TioK pGEX Micromonospora sp. ML1
1761 C A G G C G T C G A A C G G A T C C A T C C C C A A C G G G C G C C C G C G G C PCR TioK pGEX Micromonospora L13-ACM2-0

1801 C G C T T PCR TioK pGEX Micromonospora sp. ML1
1801 C G C T T PCR TioK pGEX Micromonospora L13-ACM2-0

6.3 Thiocoralin-Cluster

1) Biosynthesecluster des Thiocoralins [Lombo *et al.*, 2006].



Gen	postulierte Funktion
<i>tioA</i>	OmpR-Familien Regulator
<i>tioB</i>	Putativer Regulator
<i>tioC</i>	ABC Transporter (Permeasen Untereinheit)
<i>tioD</i>	ABC Transporter (ATPase Untereinheit)
<i>tioE</i>	MerR-Familien Regulator
<i>tioF</i>	Tryptophan-2,3-Dioxygenase
<i>tioG</i>	Aminotransferase
<i>tioH</i>	NAD- oder NADP-Oxidoreduktase
<i>tioI</i>	Cytochrom P450
<i>tioJ</i>	AMP-Ligase
<i>tioK</i>	NRPS
<i>tioL</i>	Keine Funktion durch Homologien vorhersagbar
<i>tioM</i>	Vanadium Chloroperoxidase
<i>tioN</i>	NRPS

Gen	postulierte Funktion
<i>tioO</i>	PCP-Domäne
<i>tioP</i>	Thioesterase
<i>tioQ</i>	Thioesterase
<i>tioR</i>	NRPS
<i>tioS</i>	NRPS
<i>tioT</i>	MbtH Homologon
<i>tioU</i>	DNA Excisionase
<i>tioV</i>	OmpR-Familien Regulator
<i>tioW</i>	putativer Regulator
<i>tioX</i>	Glyoxylase
<i>tioY</i>	NRPS
<i>tioZ</i>	NRPS

Tabelle 1.1: Gene des Thiocoralin-Clusters mit der durch Sequenz-Alignments bestimmten Funktion. In grau sind die Gene, die an der Biosynthese des Chromophors beteiligt sind, gekennzeichnet. In gelb, die Gene, die zur Regulation und zur Resistenz beitragen. In blau die Gene, die das Thiocoralingrundgerüst aufbauen. In grün sind Gene mit bisher unbekannter Funktion gekennzeichnet. Für TioX wird vermutet, dass es die S-Methylierung von Cystein katalysiert.

7. Literatur

- Ashrafuzzaman, M., Andersen, O.S. and McElhaney, R.N. (2008), 'The Antimicrobial Peptide Gramicidin S Permeabilizes Phospholipid Bilayer Membranes without Forming Discrete Ion Channels', *Biochim Biophys Acta*.
- Balibar, C.J., Howard-Jones, A.R. and Walsh, C.T. (2007), 'Terrequinone a Biosynthesis through L-Tryptophan Oxidation, Dimerization and Bisprenylation', *Nat Chem Biol*, 3, 9, 584-92.
- Baltz, R.H., Miao, V. and Wrigley, S.K. (2005), 'Natural Products to Drugs: Daptomycin and Related Lipopeptide Antibiotics', *Nat Prod Rep*, 22, 6, 717-41.
- Batabyal, D. and Yeh, S.R. (2007), 'Human Tryptophan Dioxygenase: A Comparison to Indoleamine 2,3-Dioxygenase', *J Am Chem Soc*, 129, 50, 15690-701.
- Baz, J.P., Millan, F.R., De Quesada, T.G. and Gravalos, D.G. (2001), 'Method of Treating Tumors with Thiodepsipeptide Isolated from a Marine Actinomycete', *United States Patent*, United States, Pharma Mar, s.a.
- Bergendahl, V., Linne, U. and Marahiel, M.A. (2002), 'Mutational Analysis of the C-Domain in Nonribosomal Peptide Synthesis', *Eur J Biochem*, 269, 2, 620-9.
- Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979), 'A Rapid Alkaline Extraction Procedure for Screening Recombinant Plasmid DNA', *Nucleic Acids Res*, 7, 6, 1513-23.
- Bradford, M.M. (1976), 'A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding', *Anal Biochem*, 72, 248-54.
- Bruner, S.D., Weber, T., Kohli, R.M., Schwarzer, D., Marahiel, M.A., Walsh, C.T. and Stubbs, M.T. (2002), 'Structural Basis for the Cyclization of the Lipopeptide Antibiotic Surfactin by the Thioesterase Domain SrfTe', *Structure*, 10, 3, 301-10.
- Bu, X., Wu, X., Ng, N.L., Mak, C.K., Qin, C. and Guo, Z. (2004), 'Synthesis of Gramicidin S and Its Analogues Via an on-Resin Macrolactamization Assisted by a Predisposed Conformation of the Linear Precursors', *J Org Chem*, 69, 8, 2681-5.
- Caboche, S., Pupin, M., Leclere, V., Fontaine, A., Jacques, P. and Kucherov, G. (2008), 'Norine: A Database of Nonribosomal Peptides', *Nucleic Acids Res*, 36, Database issue, D326-31.
- Challis, G.L. and Ravel, J. (2000), 'Coelichelin, a New Peptide Siderophore Encoded by the Streptomyces Coelicolor Genome: Structure Prediction from the Sequence of Its Non-Ribosomal Peptide Synthetase', *FEMS Microbiol Lett*, 187, 2, 111-4.
- Chen, H., Hubbard, B.K., O'Connor, S.E. and Walsh, C.T. (2002), 'Formation of Beta-Hydroxy Histidine in the Biosynthesis of Nikkomycin Antibiotics', *Chem Biol*, 9, 1, 103-12.
- Chen, H. and Walsh, C.T. (2001), 'Coumarin Formation in Novobiocin Biosynthesis: Beta-Hydroxylation of the Aminoacyl Enzyme Tyrosyl-S-NovH by a Cytochrome P450 NovI', *Chem Biol*, 8, 4, 301-12.
- Cheng, Y.Q. (2006), 'Deciphering the Biosynthetic Codes for the Potent Anti-Sars-CoV Cyclodepsipeptide Valinomycin in Streptomyces Tsusimaensis ATCC 15141', *Chembiochem*, 7, 3, 471-7.
- Conti, E., Stachelhaus, T., Marahiel, M.A. and Brick, P. (1997), 'Structural Basis for the Activation of Phenylalanine in the Non-Ribosomal Biosynthesis of Gramicidin S', *Embo J*, 16, 14, 4174-83.

- Crich, D. and Banerjee, A.** (2006), 'Expedient Synthesis of Threo-Beta-Hydroxy-Alpha-Amino Acid Derivatives: Phenylalanine, Tyrosine, Histidine, and Tryptophan', *J Org Chem*, 71, 18, 7106-9.
- Davies, J.S.** (2003), 'The Cyclization of Peptides and Depsipeptides', *J Pept Sci*, 9, 8, 471-501.
- Dawson, S., Malkinson, J.P., Paumier, D. and Searcey, M.** (2007), 'Bisintercalator Natural Products with Potential Therapeutic Applications: Isolation, Structure Determination, Synthetic and Biological Studies', *Nat Prod Rep*, 24, 1, 109-26.
- Dimise, E.J., Widboom, P.F. and Bruner, S.D.** (2008), 'Structure Elucidation and Biosynthesis of Fuscachelins, Peptide Siderophores from the Moderate Thermophile Thermobifida Fusca', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 40, 15311-6.
- Doekel, S.** (2000), 'Synthese Von Dipeptiden an Hybriden Peptidsynthetasen', *Philipps-Universität, Marburg, Philipps-Universität*.
- Duerfahrt, T., Eppelmann, K., Muller, R. and Marahiel, M.A.** (2004), 'Rational Design of a Bimodular Model System for the Investigation of Heterocyclization in Nonribosomal Peptide Biosynthesis', *Chem Biol*, 11, 2, 261-71.
- Edwards, D.J. and Gerwick, W.H.** (2004), 'Lyngbyatoxin Biosynthesis: Sequence of Biosynthetic Gene Cluster and Identification of a Novel Aromatic Prenyltransferase', *J Am Chem Soc*, 126, 37, 11432-3.
- Ehling-Schulz, M., Fricker, M., Grallert, H., Rieck, P., Wagner, M. and Scherer, S.** (2006), 'Cereulide Synthetase Gene Cluster from Emetic Bacillus Cereus: Structure and Location on a Mega Virulence Plasmid Related to Bacillus Anthracis Toxin Plasmid Pxo1', *BMC Microbiol*, 6, 20.
- Erlnager, B.F. and Goode, L.** (1954), 'Gramicidin S; Relationship of Cyclic Structure to Antibiotic Activity', *Nature*, 174, 4435, 840-1.
- Felnagle, E.A., Jackson, E.E., Chan, Y.A., Podevels, A.M., Berti, A.D., McMahon, M.D. and Thomas, M.G.** (2008), 'Nonribosomal Peptide Synthetases Involved in the Production of Medically Relevant Natural Products', *Mol Pharm*, 5, 2, 191-211.
- Fischbach, M.A., Lin, H., Liu, D.R. and Walsh, C.T.** (2005), 'In Vitro Characterization of IroB, a Pathogen-Associated C-Glycosyltransferase', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 3, 571-6.
- Fujimori, D.G., Hrvatin, S., Neumann, C.S., Strieker, M., Marahiel, M.A. and Walsh, C.T.** (2007), 'Cloning and Characterization of the Biosynthetic Gene Cluster for Kutznierides', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 42, 16498-503.
- Garcia-Martin, F., Cruz, L.J., Rodriguez-Mias, R.A., Giralt, E. and Albericio, F.** (2008), 'Design and Synthesis of FAJANU: A De Novo C(2) Symmetric Cyclopeptide Family', *J Med Chem*, 51, 11, 3194-202.
- Gauge, G. and Brazhnikova, M.** (1944), 'Gramicidin S and Its Use in the Treatment of Infected Wounds', *Nature*, 154, 3918, 703.
- Gehring, A.M., Mori, I. and Walsh, C.T.** (1998), 'Reconstitution and Characterization of the Escherichia Coli Enterobactin Synthetase from EntB, EntE, and EntF', *Biochemistry*, 37, 8, 2648-59.
- Gibbs, A.C., Kondejewski, L.H., Gronwald, W., Nip, A.M., Hodges, R.S., Sykes, B.D. and Wishart, D.S.** (1998), 'Unusual Beta-Sheet Periodicity in Small Cyclic Peptides', *Nat Struct Biol*, 5, 4, 284-8.
- Gill, S.C. and von Hippel, P.H.** (1989), 'Calculation of Protein Extinction Coefficients from Amino Acid Sequence Data', *Anal Biochem*, 182, 2, 319-26.

- Glinski, M., Urbanke, C., Hornbogen, T. and Zocher, R.** (2002), 'Enniatin Synthetase Is a Monomer with Extended Structure: Evidence for an Intramolecular Reaction Mechanism', *Arch Microbiol*, 178, 4, 267-73.
- Grunewald, J. and Marahiel, M.A.** (2006), 'Chemoenzymatic and Template-Directed Synthesis of Bioactive Macrocyclic Peptides', *Microbiol Mol Biol Rev*, 70, 1, 121-46.
- Grunewald, J., Sieber, S.A., Mahlert, C., Linne, U. and Marahiel, M.A.** (2004), 'Synthesis and Derivatization of Daptomycin: A Chemoenzymatic Route to Acidic Lipopeptide Antibiotics', *J Am Chem Soc*, 126, 51, 17025-31.
- Guenzi, E., Galli, G., Grgurina, I., Gross, D.C. and Grandi, G.** (1998), 'Characterization of the Syringomycin Synthetase Gene Cluster. A Link between Prokaryotic and Eukaryotic Peptide Synthetases', *J Biol Chem*, 273, 49, 32857-63.
- Guzman, L.M., Belin, D., Carson, M.J. and Beckwith, J.** (1995), 'Tight Regulation, Modulation, and High-Level Expression by Vectors Containing the Arabinose PBAD Promoter', *J Bacteriol*, 177, 14, 4121-30.
- Han, Q., Fang, J. and Li, J.** (2001), 'Kynurenine Aminotransferase and Glutamine Transaminase K of Escherichia Coli: Identity with Aspartate Aminotransferase', *Biochem J*, 360, Pt 3, 617-23.
- Han, Q. and Li, J.** (2004), 'pH Dependence, Substrate Specificity and Inhibition of Human Kynurenine Aminotransferase I', *Eur J Biochem*, 271, 23-24, 4804-14.
- Healy, F.G., Wach, M., Krasnoff, S.B., Gibson, D.M. and Loria, R.** (2000), 'The TxtAB Genes of the Plant Pathogen Streptomyces Acidiscabies Encode a Peptide Synthetase Required for Phytotoxin Thaxtomin a Production and Pathogenicity', *Mol Microbiol*, 38, 4, 794-804.
- Hitchcock, M.J. and Katz, E.** (1988), 'Purification and Characterization of Tryptophan Dioxygenase from Streptomyces Parvulus', *Arch Biochem Biophys*, 261, 1, 148-60.
- Hubbard, B.K. and Walsh, C.T.** (2003), 'Vancomycin Assembly: Nature's Way', *Angew Chem Int Ed Engl*, 42, 7, 730-65.
- Isin, E.M. and Guengerich, F.P.** (2007), 'Complex Reactions Catalyzed by Cytochrome P450 Enzymes', *Biochim Biophys Acta*, 1770, 3, 314-29.
- Isin, E.M. and Guengerich, F.P.** (2008), 'Substrate Binding to Cytochromes P450', *Anal Bioanal Chem*.
- Jelokhani-Niaraki, M., Kondejewski, L.H., Farmer, S.W., Hancock, R.E., Kay, C.M. and Hodges, R.S.** (2000), 'Diastereoisomeric Analogues of Gramicidin S: Structure, Biologicalactivity and Interaction with Lipid Bilayers', *Biochem J*, 349 Pt 3, 747-55.
- Kahne, D., Leimkuhler, C., Lu, W. and Walsh, C.** (2005), 'Glycopeptide and Lipoglycopeptide Antibiotics', *Chem Rev*, 105, 2, 425-48.
- Kappe, C.O. and Stadler, A.** (2005), *Microwaves in Organic and Medicinal Chemistry*, Wiley-VCH.
- Kohli, R.M., Trauger, J.W., Schwarzer, D., Marahiel, M.A. and Walsh, C.T.** (2001), 'Generality of Peptide Cyclization Catalyzed by Isolated Thioesterase Domains of Nonribosomal Peptide Synthetases', *Biochemistry*, 40, 24, 7099-108.
- Koketsu, K., Oguri, H., Watanabe, K. and Oikawa, H.** (2006), 'Identification and Stereochemical Assignment of the Beta-Hydroxytryptophan Intermediate in the Echinomycin Biosynthetic Pathway', *Org Lett*, 8, 21, 4719-22.
- Koketsu, K., Oguri, H., Watanabe, K. and Oikawa, H.** (2008), 'Enzymatic Macrolactonization in the Presence of DNA Leading to Triostin A Analogs', *Chem Biol*, 15, 8, 818-28.

- Kondejewski, L.H., Farmer, S.W., Wishart, D.S., Kay, C.M., Hancock, R.E. and Hodges, R.S.** (1996), 'Modulation of Structure and Antibacterial and Hemolytic Activity by Ring Size in Cyclic Gramicidin S Analogs', *J Biol Chem*, 271, 41, 25261-8.
- Kondejewski, L.H., Jelokhani-Niaraki, M., Farmer, S.W., Lix, B., Kay, C.M., Sykes, B.D., Hancock, R.E. and Hodges, R.S.** (1999), 'Dissociation of Antimicrobial and Hemolytic Activities in Cyclic Peptide Diastereomers by Systematic Alterations in Amphipathicity', *J Biol Chem*, 274, 19, 13181-92.
- Kondejewski, L.H., Lee, D.L., Jelokhani-Niaraki, M., Farmer, S.W., Hancock, R.E. and Hodges, R.S.** (2002), 'Optimization of Microbial Specificity in Cyclic Peptides by Modulation of Hydrophobicity within a Defined Structural Framework', *J Biol Chem*, 277, 1, 67-74.
- Kopp, F., Mahlert, C., Grunewald, J. and Marahiel, M.A.** (2006), 'Peptide Macrocyclization: The Reductase of the Nostocyclopeptide Synthetase Triggers the Self-Assembly of a Macrocyclic Imine', *J Am Chem Soc*, 128, 51, 16478-9.
- Kopp, F. and Marahiel, M.A.** (2007), 'Macrocyclization Strategies in Polyketide and Nonribosomal Peptide Biosynthesis', *Nat Prod Rep*, 24, 4, 735-49.
- Kratzschmar, J., Krause, M. and Marahiel, M.A.** (1989), 'Gramicidin S Biosynthesis Operon Containing the Structural Genes GrsA and GrsB has an Open Reading Frame Encoding a Protein Homologous to Fatty Acid Thioesterases', *J Bacteriol*, 171, 10, 5422-9.
- Lambalot, R.H., Gehring, A.M., Flugel, R.S., Zuber, P., LaCelle, M., Marahiel, M.A., Reid, R., Khosla, C. and Walsh, C.T.** (1996), 'A New Enzyme Superfamily - the Phosphopantetheinyl Transferases', *Chem Biol*, 3, 11, 923-36.
- Lee, J.S. and Waring, M.J.** (1978), 'Bifunctional Intercalation and Sequence Specificity in the Binding of Quinomycin and Triostin Antibiotics to Deoxyribonucleic Acid', *Biochem J*, 173, 1, 115-28.
- Leopoldina** (2007), 'Bakterielle Resistenzen: Eine weltweite Bedrohung – Akademie Leopoldina fordert umfassende Maßnahmen', *Pressemitteilung*.
- Locuson, C.W., Hutzler, J.M. and Tracy, T.S.** (2007), 'Visible Spectra of Type II Cytochrome P450-Drug Complexes: Evidence That "Incomplete" Heme Coordination Is Common', *Drug Metab Dispos*, 35, 4, 614-22.
- Lombo, F., Velasco, A., Castro, A., de la Calle, F., Brana, A.F., Sanchez-Puelles, J.M., Mendez, C. and Salas, J.A.** (2006), 'Deciphering the Biosynthesis Pathway of the Antitumor Thiocoraline from a Marine Actinomycete and Its Expression in Two Streptomyces Species', *Chembiochem*, 7, 2, 366-76.
- Mahlert, C.** (2007), 'Streptogramin B-Antibiotika und azide Lipopeptide: Chemoenzymatische Derivatisierung der Makrozyklen und Biosynthese nichtproteinogener Bausteine', *Dissertation, Fachbereich Chemie*, Philipps-Universität, Marburg.
- Mahlert, C., Kopp, F., Thirlway, J., Micklefield, J. and Marahiel, M.A.** (2007), 'Stereospecific Enzymatic Transformation of Alpha-Ketoglutarate to (2S,3R)-3-Methyl Glutamate During Acidic Lipopeptide Biosynthesis', *J Am Chem Soc*, 129, 39, 12011-8.
- Mahlert, C., Sieber, S.A., Grunewald, J. and Marahiel, M.A.** (2005), 'Chemoenzymatic Approach to Enantiopure Streptogramin B Variants: Characterization of Stereoselective Pristinamycin I Cyclase from Streptomyces Pristinaespiralis', *J Am Chem Soc*, 127, 26, 9571-80.
- Marahiel, M.A., Stachelhaus, T. and Mootz, H.D.** (1997), 'Modular Peptide Synthetases Involved in Nonribosomal Peptide Synthesis', *Chem Rev*, 97, 7, 2651-2674.

- May, J.J., Kessler, N., Marahiel, M.A. and Stubbs, M.T.** (2002), 'Crystal Structure of DhbE, an Archetype for Aryl Acid Activating Domains of Modular Nonribosomal Peptide Synthetases', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 19, 12120-5.
- McLean, K.J., Dunford, A.J., Sabri, M., Neeli, R., Girvan, H.M., Balding, P.R., Leys, D., Seward, H.E., Marshall, K.R. and Munro, A.W.** (2006), 'Cyp121, Cyp51 and Associated Redox Systems in Mycobacterium Tuberculosis: Towards Deconvoluting Enzymology of P450 Systems in a Human Pathogen', *Biochem Soc Trans*, 34, Pt 6, 1178-82.
- Mehta, P.K., Hale, T.I. and Christen, P.** (1993), 'Aminotransferases: Demonstration of Homology and Division into Evolutionary Subgroups', *Eur J Biochem*, 214, 2, 549-61.
- Miao, V., Coeffet-Legal, M.F., Brian, P., Brost, R., Penn, J., Whiting, A., Martin, S., Ford, R., Parr, I., Bouchard, M., Silva, C.J., Wrigley, S.K. and Baltz, R.H.** (2005), 'Daptomycin Biosynthesis in Streptomyces Roseosporus: Cloning and Analysis of the Gene Cluster and Revision of Peptide Stereochemistry', *Microbiology*, 151, Pt 5, 1507-23.
- Miller, J.H.** (1992), *A Short Course in Bacterial Genetics: A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia Coli and Related Bacteria.*, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Mootz, H.D. and Marahiel, M.A.** (1997), 'The Tyrocidine Biosynthesis Operon of Bacillus Brevis: Complete Nucleotide Sequence and Biochemical Characterization of Functional Internal Adenylation Domains', *J Bacteriol*, 179, 21, 6843-50.
- Mootz, H.D., Schwarzer, D. and Marahiel, M.A.** (2002), 'Ways of Assembling Complex Natural Products on Modular Nonribosomal Peptide Synthetases', *ChemBiochem*, 3, 6, 490-504.
- Narasimhulu, S.** (2007), 'Differential Behavior of the Sub-Sites of Cytochrome 450 Active Site in Binding of Substrates, and Products (Implications for Coupling/Uncoupling)', *Biochim Biophys Acta*, 1770, 3, 360-75.
- Nebert, D.W. and Gonzalez, F.J.** (1987), 'P450 Genes: Structure, Evolution, and Regulation', *Annu Rev Biochem*, 56, 945-93.
- Negri, A., Marco, E., Garcia-Hernandez, V., Domingo, A., Llamas-Saiz, A.L., Porto-Sanda, S., Riguera, R., Laine, W., David-Cordonnier, M.H., Bailly, C., Garcia-Fernandez, L.F., Vaquero, J.J. and Gago, F.** (2007), 'Antitumor Activity, X-Ray Crystal Structure, and DNA Binding Properties of Thiocoraline A, a Natural Bisintercalating Thiodepsipeptide', *J Med Chem*, 50, 14, 3322-33.
- Newman, D.J. and Cragg, G.M.** (2007), 'Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years', *J Nat Prod*, 70, 3, 461-77.
- Nolan, E.M. and Walsh, C.T.** (2008), 'Investigations of the MceJ-Catalyzed Posttranslational Modification of the Microcin E492 C-Terminus: Linkage of Ribosomal and Nonribosomal Peptides to Form "Trojan Horse" Antibiotics', *Biochemistry*, 47, 35, 9289-99.
- Omura, T. and Sato, R.** (1964a), 'The Carbon Monoxide-Binding Pigment of Liver Microsomes. I. Evidence for Its Hemoprotein Nature', *J Biol Chem*, 239, 2370-8.
- Omura, T. and Sato, R.** (1964b), 'The Carbon Monoxide-Binding Pigment of Liver Microsomes. II. Solubilization, Purification, and Properties', *J Biol Chem*, 239, 2379-85.
- Pettit, G.R., Tan, R., Melody, N., Kieley, J.M., Pettit, R.K., Herald, D.L., Tucker, B.E., Mallavia, L.P., Doubek, D.L. and Schmidt, J.M.** (1999), 'Antineoplastic Agents. Part 409: Isolation and Structure of Montanastatin from a Terrestrial Actinomycete', *Bioorg Med Chem*, 7, 5, 895-9.
- PharmaMar** (2008), 'Homepage PharmaMar', www.pharmamar.com/en/pipeline/.

- Pohlmann, V. and Marahiel, M.A.** (2008), 'Delta-Amino Group Hydroxylation of L-Ornithine During Coelichelin Biosynthesis', *Org Biomol Chem*, 6, 10, 1843-8.
- Rausch, C., Weber, T., Kohlbacher, O., Wohlleben, W. and Huson, D.H.** (2005), 'Specificity Prediction of Adenylation Domains in Nonribosomal Peptide Synthetases (NRPS) Using Transductive Support Vector Machines (TSVMS)', *Nucleic Acids Res*, 33, 18, 5799-808.
- Reuter, K., Mofid, M.R., Marahiel, M.A. and Ficner, R.** (1999), 'Crystal Structure of the Surfactin Synthetase-Activating Enzyme Sfp: A Prototype of the 4'-Phosphopantetheinyl Transferase Superfamily', *Embo J*, 18, 23, 6823-31.
- Roach, P.L., Clifton, I.J., Hensgens, C.M., Shibata, N., Schofield, C.J., Hajdu, J. and Baldwin, J.E.** (1997), 'Structure of Isopenicillin N Synthase Complexed with Substrate and the Mechanism of Penicillin Formation', *Nature*, 387, 6635, 827-30.
- Robbel, L., Hoyer, K.M. and Marahiel, M.A.** (2008), 'TioS T-Te - a Prototypical Thioesterase Responsible for Cyclodimerization of the Quinoline- and Quinoxaline-Type Class of Chromodopsipeptides', *FEBS Journal*, submitted.
- Sakuraba, H., Kawakami, R., Takahashi, H. and Ohshima, T.** (2004), 'Novel Archaeal Alanine:Glyoxylate Aminotransferase from *Thermococcus Litoralis*', *J Bacteriol*, 186, 16, 5513-8.
- Salgado, J., Grage, S.L., Kondejewski, L.H., Hodges, R.S., McElhaney, R.N. and Ulrich, A.S.** (2001), 'Membrane-Bound Structure and Alignment of the Antimicrobial Beta-Sheet Peptide Gramicidin S Derived from Angular and Distance Constraints by Solid State 19f-Nmr', *J Biomol NMR*, 21, 3, 191-208.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T.** (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Samel, S.A., Marahiel, M.A. and Essen, L.O.** (2008), 'How to Tailor Non-Ribosomal Peptide Products--New Clues About the Structures and Mechanisms of Modifying Enzymes', *Mol Biosyst*, 4, 5, 387-93.
- Samel, S.A., Schoenafinger, G., Knappe, T.A., Marahiel, M.A. and Essen, L.O.** (2007), 'Structural and Functional Insights into a Peptide Bond-Forming Bidomain from a Nonribosomal Peptide Synthetase', *Structure*, 15, 7, 781-92.
- Samel, S.A., Wagner, B., Marahiel, M.A. and Essen, L.O.** (2006), 'The Thioesterase Domain of the Fengycin Biosynthesis Cluster: A Structural Base for the Macrocyclization of a Non-Ribosomal Lipopeptide', *J Mol Biol*, 359, 4, 876-89.
- Sattely, E.S., Fischbach, M.A. and Walsh, C.T.** (2008), 'Total Biosynthesis: In Vitro Reconstitution of Polyketide and Nonribosomal Peptide Pathways', *Nat Prod Rep*, 25, 4, 757-93.
- Schauwecker, F., Pfennig, F., Grammel, N. and Keller, U.** (2000), 'Construction and in Vitro Analysis of a New Bi-Modular Polypeptide Synthetase for Synthesis of N-Methylated Acyl Peptides', *Chem Biol*, 7, 4, 287-97.
- Schmoock, G., Pfennig, F., Jewiarz, J., Schlumbohm, W., Laubinger, W., Schauwecker, F. and Keller, U.** (2005), 'Functional Cross-Talk between Fatty Acid Synthesis and Nonribosomal Peptide Synthesis in Quinoxaline Antibiotic-Producing Streptomycetes', *J Biol Chem*, 280, 6, 4339-49.
- Schracke, N., Linne, U., Mahlert, C. and Marahiel, M.A.** (2005), 'Synthesis of Linear Gramicidin Requires the Cooperation of Two Independent Reductases', *Biochemistry*, 44, 23, 8507-13.
- Schwyzler, R. and Ludescher, U.** (1968), 'Conformational Study of Gramicidin S Using the Phthalimide Group as Nuclear Magnetic Resonance Marker', *Biochemistry*, 7, 7, 2519-22.

- Scutcliffe, J.G.** (1979), 'Complete Nucleotide Sequence of the *E. Coli* Plasmid PBR322', *Methods in Enzymology*, 77-90.
- Shaw-Reid, C.A., Kelleher, N.L., Losey, H.C., Gehring, A.M., Berg, C. and Walsh, C.T.** (1999), 'Assembly Line Enzymology by Multimodular Nonribosomal Peptide Synthetases: The Thioesterase Domain of *E. Coli* EntF Catalyzes Both Elongation and Cyclolactonization', *Chem Biol*, 6, 6, 385-400.
- Sheoran, A., King, A., Velasco, A., Pero, J.M. and Garneau-Tsodikova, S.** (2008), 'Characterization of TioF, a Tryptophan 2,3-Dioxygenase Involved in 3-Hydroxyquinaldic Acid Formation During Thiocoraline Biosynthesis', *Mol Biosyst*, 4, 6, 622-8.
- Sieber, S.A., Linne, U., Hillson, N.J., Roche, E., Walsh, C.T. and Marahiel, M.A.** (2002), 'Evidence for a Monomeric Structure of Nonribosomal Peptide Synthetases', *Chem Biol*, 9, 9, 997-1008.
- Sieber, S.A., Tao, J., Walsh, C.T. and Marahiel, M.A.** (2004), 'Peptidyl Thiophenols as Substrates for Nonribosomal Peptide Cyclases', *Angew Chem Int Ed Engl*, 43, 4, 493-8.
- Stachelhaus, T., Huser, A. and Marahiel, M.A.** (1996), 'Biochemical Characterization of Peptidyl Carrier Protein (PCP), the Thiolation Domain of Multifunctional Peptide Synthetases', *Chem Biol*, 3, 11, 913-21.
- Stachelhaus, T., Mootz, H.D., Bergendahl, V. and Marahiel, M.A.** (1998), 'Peptide Bond Formation in Nonribosomal Peptide Biosynthesis. Catalytic Role of the Condensation Domain', *J Biol Chem*, 273, 35, 22773-81.
- Stachelhaus, T., Mootz, H.D. and Marahiel, M.A.** (1999), 'The Specificity-Conferring Code of Adenylation Domains in Nonribosomal Peptide Synthetases', *Chem Biol*, 6, 8, 493-505.
- Stein, D.B., Linne, U., Hahn, M. and Marahiel, M.A.** (2006), 'Impact of Epimerization Domains on the Intermodular Transfer of Enzyme-Bound Intermediates in Nonribosomal Peptide Synthesis', *Chembiochem*, 7, 11, 1807-14.
- Stein, D.B., Linne, U. and Marahiel, M.A.** (2005), 'Utility of Epimerization Domains for the Redesign of Nonribosomal Peptide Synthetases', *FEBS J*, 272, 17, 4506-20.
- Stoll, E., Froyshov, O., Holm, H., Zimmer, T.L. and Laland, S.G.** (1970), 'On the Mechanism of Gramicidin S Formation from Intermediate Peptides', *FEBS Lett*, 11, 5, 348-352.
- Stüber, D., Matile, H. and Garotta, G.** (1990), 'System for High-Level Production in *Escherichia Coli* and Rapid Purification of Recombinant Proteins: Application to Epitope Mapping, Preparation of Antibodies, and Structure-Function Analysis.' *Immunol. Methods*, 121-152.
- Tanovic, A., Samel, S.A., Essen, L.O. and Marahiel, M.A.** (2008), 'Crystal Structure of the Termination Module of a Nonribosomal Peptide Synthetase', *Science*, 321, 5889, 659-63.
- Tomoda, H., Nishida, H., Huang, X.H., Masuma, R., Kim, Y.K. and Omura, S.** (1992), 'New Cyclodepsipeptides, Enniatins D, E and F Produced by *Fusarium Sp.* Fo-1305', *J Antibiot (Tokyo)*, 45, 8, 1207-15.
- Trauger, J.W., Kohli, R.M., Mootz, H.D., Marahiel, M.A. and Walsh, C.T.** (2000), 'Peptide Cyclization Catalysed by the Thioesterase Domain of Tyrocidine Synthetase', *Nature*, 407, 6801, 215-8.
- Trauger, J.W., Kohli, R.M. and Walsh, C.T.** (2001), 'Cyclization of Backbone-Substituted Peptides Catalyzed by the Thioesterase Domain from the Tyrocidine Nonribosomal Peptide Synthetase', *Biochemistry*, 40, 24, 7092-8.
- Tseng, C.C., Bruner, S.D., Kohli, R.M., Marahiel, M.A., Walsh, C.T. and Sieber, S.A.** (2002), 'Characterization of the Surfactin Synthetase C-Terminal Thioesterase Domain as a Cyclic Depsipeptide Synthase', *Biochemistry*, 41, 45, 13350-9.

- Vainio, H. and Morgan, G.** (1997), 'Aspirin for the Second Hundred Years: New Uses for an Old Drug', *Pharmacol Toxicol*, 81, 4, 151-2.
- Wadhwani, P., Afonin, S., Ieronimo, M., Buerck, J. and Ulrich, A.S.** (2006), 'Optimized Protocol for Synthesis of Cyclic Gramicidin S: Starting Amino Acid Is Key to High Yield', *J Org Chem*, 71, 1, 55-61.
- Walsh, C.** (2000), 'Molecular Mechanisms That Confer Antibacterial Drug Resistance', *Nature*, 406, 6797, 775-81.
- Watanabe, K.** (2008), 'Exploring the Biosynthesis of Natural Products and Their Inherent Suitability for the Rational Design of Desirable Compounds through Genetic Engineering', *Biosci Biotechnol Biochem*.
- Watanabe, K., Hotta, K., Praseuth, A.P., Koketsu, K., Migita, A., Boddy, C.N., Wang, C.C., Oguri, H. and Oikawa, H.** (2006), 'Total Biosynthesis of Antitumor Nonribosomal Peptides in Escherichia Coli', *Nat Chem Biol*, 2, 8, 423-8.
- Weber, G., Schorgendorfer, K., Schneider-Scherzer, E. and Leitner, E.** (1994), 'The Peptide Synthetase Catalyzing Cyclosporine Production in Tolypocladium Niveum Is Encoded by a Giant 45.8-Kilobase Open Reading Frame', *Curr Genet*, 26, 2, 120-5.
- Woithe, K., Geib, N., Zerbe, K., Li, D.B., Heck, M., Fournier-Rousset, S., Meyer, O., Vitali, F., Matoba, N., Abou-Hadeed, K. and Robinson, J.A.** (2007), 'Oxidative Phenol Coupling Reactions Catalyzed by OxyB: A Cytochrome P450 from the Vancomycin Producing Organism. Implications for Vancomycin Biosynthesis', *J Am Chem Soc*, 129, 21, 6887-95.
- Wu, X., Bu, X., Wong, K.M., Yan, W. and Guo, Z.** (2003), 'Biomimetic Synthesis of Gramicidin S and Analogues by Enzymatic Cyclization of Linear Precursors on Solid Support', *Org Lett*, 5, 10, 1749-52.
- Xu, Y., Orozco, R., Wijeratne, E.M., Gunatilaka, A.A., Stock, S.P. and Molnar, I.** (2008), 'Biosynthesis of the Cyclooligomer Depsipeptide Beauvericin, a Virulence Factor of the Entomopathogenic Fungus Beauveria Bassiana', *Chem Biol*, 15, 9, 898-907.
- Zamenhof, P.J. and Villarejo, M.** (1972), 'Construction and Properties of Escherichia Coli Strains Exhibiting -Complementation of -Galactosidase Fragments in Vivo', *J Bacteriol*, 110, 1, 171-8.
- Zhang, Y., Kang, S.A., Mukherjee, T., Bale, S., Crane, B.R., Begley, T.P. and Ealick, S.E.** (2007), 'Crystal Structure and Mechanism of Tryptophan 2,3-Dioxygenase, a Heme Enzyme Involved in Tryptophan Catabolism and in Quinolate Biosynthesis', *Biochemistry*, 46, 1, 145-55.

Danksagung

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Mohamed A. Marahiel, der mich stets unterstützte und mit einer stetigen Diskussionsbereitschaft diese Arbeit förderte. Neben finanziellen Mitteln für die Forschung ermöglichte er mir auch die Teilnahme an interessanten Konferenzen, sowie die Möglichkeit meine Arbeit im Rahmen eines EU-Projektes zu präsentieren und mit anderen Gruppen zu diskutieren.

Herrn Prof. Dr. Lars-Oliver Essen danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Herrn Prof. Dr. Norbert Hampp und Herrn Prof. Dr. Armin Geyer danke ich dafür, dass sie sich als weitere Mitglieder der Prüfungskommission bereitwillig zur Verfügung gestellt haben.

Mein Dank gilt allen Mitgliedern des Arbeitskreises Marahiel für die anregenden Fachgespräche, die Hilfsbereitschaft und die Unterstützung. Weiterhin bedanke ich mich für die schönen gemeinsamen Stunden auch außerhalb des Laboralltages. So konnte ich viele Kollegen auch als neue Freunde gewinnen. Besonders möchte ich mich bei den Laborkollegen aus 4716 bedanken, deren Zusammenhalt stets eine gute Arbeitsatmosphäre geschaffen hat.

Dr. Uwe Linne danke ich für die Unterstützung bei massenspektrometrischen Messungen.

Bei Verena Pohlmann, Dr. Christoph Mahlert und Dr. Frank Wiegeshoff möchte ich mich für das Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken.

Für die technische Unterstützung möchte ich mich bei Antje Schäfer, Christiane Bomm und Gabriele Schimpff-Weiland bedanken. Besonderer Dank gilt Carola Kisselbach, die unermüdlich ihre Einsatzbereitschaft zur Verfügung gestellt hat.

Weiterhin bedanke ich mich bei Frank für die stetige Unterstützung und Diskussionsbereitschaft.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, die mich auf jedem Weg unterstützt haben und mir stets Rückhalt geben.

